

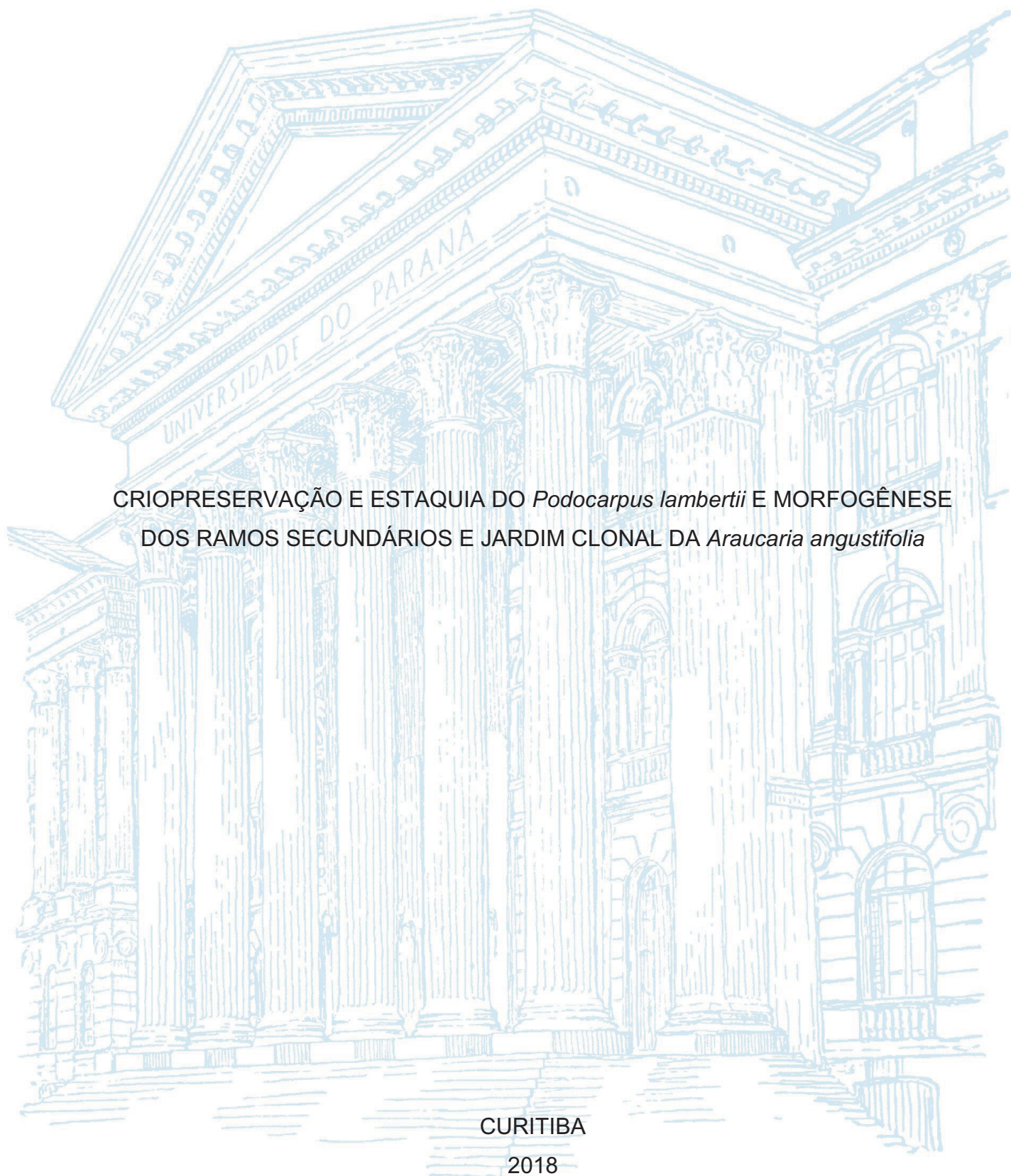
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE FRIZZO

CRIOPRESERVAÇÃO E ESTAQUIA DO *Podocarpus lambertii* E MORFOGÊNESE
DOS RAMOS SECUNDÁRIOS E JARDIM CLONAL DA *Araucaria angustifolia*

CURITIBA

2018



CAROLINE FRIZZO

CRIOPRESERVAÇÃO E ESTAQUIA DO *Podocarpus lambertii* E MORFOGÊNESE
DOS RAMOS SECUNDÁRIOS E JARDIM CLONAL DA *Araucaria angustifolia*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Flavio Zanette
Co-orientador: Dr. Valdeci Constantino

CURITIBA

2018

F921c Frizzo, Caroline
Criopreservação e estaquia do *Podocarpus lambertii* e
morfogênese dos ramos secundários e jardim clonal da *Araucaria
angustifolia* / Caroline Frizzo. - Curitiba, 2018.
93 p.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia -
(Produção Vegetal).

Orientador: Flavio Zanette

Coorientador: Valdeci Constantino

1. Pinheiro-bravo. 2. Pinheiro-do-paraná. 3. Enxertia. 4. Árvores
- Propagação vegetativa. I. Zanette, Flavio. II. Constantino,
Valdeci. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 582.473



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINE FRIZZO** intitulada: **CRIOPRESERVAÇÃO E ESTAQUIA DO *Podocarpus lambertii* E MORFOGÊNESE DOS RAMOS SECUNDÁRIOS E JARDIM CLONAL DA *Araucaria angustifolia***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 15 de Maio de 2018.

FLÁVIO ZANETTE
Presidente da Banca Examinadora

LUIZ ANTONIO BIASI
Avaliador Interno

HENRIQUE SOARES KÖHLER
Avaliador Interno

VALDECI CONSTANTINO
Avaliador Externo

IVAIR WENDLING
Avaliador Externo

Dedico esse trabalho aos meus pais
Maurivan L. Frizzo e Gissella M. C. Frizzo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao curso de Pós-graduação em Agronomia- Produção Vegetal por todo o apoio na condução deste trabalho e a CAPES pela concessão da bolsa.

Meus pais Maurivan L. Frizzo e Gissella M. Cordasso Frizzo e minha irmã Camila Frizzo por ser a minha família e a minha base.

Ao Mario Benato Sanches Coso pelo apoio e ajuda durante o doutorado, por ser meu amigo e companheiro para a vida toda, sem você boa parte deste trabalho não seria concluído.

Ao professor Flavio Zanette, por ter me aceitado me orientar e por compartilhar o seu conhecimento. E ao Valdeci Constantino por ter auxiliado desde a coleta dos dados até na orientação.

A Vanessa Reinhart, Cassiane Stella, Lucivani Zatta, e Vanessa Cassol amigas de longa data.

A professora Daniella Nogueira Moraes Carneiro pela valiosa amizade e carinho com o próximo.

Minhas parceiras de futebol, por tornarem as terças melhores.

Aos colegas de laboratório Crizane Hackbarth e Leandro M. Vieira por toda a ajuda, alegrias e trabalho compartilhado.

A Grasiela B. Tognon, Michele Trombini, Mirele Trombini, Lais Gomes Adamuchio e Francielen Sá pela amizade e companhia.

Aos técnicos de laboratório Isabel, Carlos, Roger e Nilson por auxiliarem na conclusão deste trabalho. Ao professor Bruno Brasileiro pela ajuda nas análises estatísticas e ao professor Anderson Barison do departamento de química por toda a assistência.

A Lucimara Antunes secretária do curso de Pós-graduação em Agronomia Produção Vegetal por toda a atenção dedicada nesse período.

Deus e ao meu anjo da guarda, obrigada por sempre estarem guiando meus passos.

E a todos que de alguma forma com o seu jeito contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo, serei eternamente grata a cada um.

Um único sonho é mais poderoso
do que mil realidades.

J. R. R. Tolkien

RESUMO

No Brasil há duas famílias de coníferas nativas, a Podocarpaceae e a Araucariaceae, o *Podocarpus lambertii* e a *Araucaria angustifolia*, respectivamente são representantes destas famílias. São espécies originárias da Floresta Ombrófila Mista, que atualmente conta com aproximadamente 2% de sua área original. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as sementes de *P. lambertii* submetidas à criopreservação e compreender os aspectos da propagação vegetativa tanto do *P. lambertii* como da *A. angustifolia*. Consequentemente, os objetivos específicos foram: avaliar o tamanho, a anatomia, composição química e germinação das sementes de *P. lambertii* após a desidratação, criopreservação e descongelamento; Desenvolver uma metodologia para a propagação vegetativa do pinheiro bravo (*P. lambertii*) via estaquia; Descrever o comportamento morfológico e o tropismo dos ramos secundários de *A. angustifolia* propagados por enxertia e estaquia e avaliar as brotações de matrizes enxertadas de *A. angustifolia* mantidas em jardim clonal, após poda. Sementes de *P. lambertii* recém colhidas e desidratadas e criopreservadas por diferentes períodos e descongeladas de duas formas: a rápida (3 min) e a lenta (30 min). Na definição do protocolo de estaquia, foram testadas 4 concentrações de AIB (0, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹) e mais uma solução hidroalcoólica e três tipos de estacas: de 5 cm (primeiro e segundo segmento nodal) e de 10 cm de comprimento nas 4 estações do ano. Propágulos de grimpas foram retirados de uma matriz adulta e foram submetidos à enxertia e estaquia e avaliando o hábito de crescimento e morfologia. Para avaliação do potencial de produção de brotações de *A. angustifolia* foi feito um corte acima da área enxertada e avaliado o número e altura das brotações a cada 30 dias durante 6 meses, em duas matrizes diferentes: a Kaiová e a Multiflora. Conclui-se que a criopreservação é uma alternativa para a conservação ex situ de *P. lambertii*; A utilização de AIB não tem influência no enraizamento de *P. lambertii*; Os resultados apontam diferenças marcantes na morfologia das grimpas de *A. angustifolia* enxertadas e enraizadas; Estacas de ramos secundários permanecem vivas após 11 anos, com crescimento plagiotrópico e rasteiro necessitando de tutoramento. A quantidade de brotações, altura e diâmetro, evidenciam a alta capacidade de produção de propágulos em um jardim clonal, após os seis meses da poda.

Palavras-chave: Pinheiro Bravo; Pinheiro do Paraná; Conservação; Enxertia; Propagação Vegetativa;

ABSTRACT

In Brazil there are two families of native conifers, Podocarpaceae and Araucariaceae; *Podocarpus lambertii* and *Araucaria angustifolia*, respectively, are representatives of these families. They are species from the Mixed Ombrophilous Forest, which currently has approximately 2% of its original area. The general objectives of this work were to evaluate *P. lambertii* seeds subjected to cryopreservation and to understand the vegetative propagation aspects of both *P. lambertii* and *A. angustifolia*. Consequently, the specific objectives were: to evaluate size, anatomy, germination and chemical composition of *P. lambertii* seeds after dehydration, cryopreservation and thawing; To develop a methodology for the vegetative propagation of “pinheiro bravo” (*P. lambertii*) by cutting; To describe the morphological behavior and tropism of the secondary branches of *A. angustifolia* propagated by grafting and cutting and to evaluate the sprouting of grafted matrices of *A. angustifolia* maintained in a clonal forestry after pruning. Freshly harvested seeds of *P. lambertii* were dehydrated and cryopreserved for different periods and thawed in two ways: fast (3 min) and slow (30 min). In the definition of the cutting protocol, 4 concentrations of IBA (0, 500, 1000 and 2000 mg L⁻¹) and a hydro alcoholic solution, and three types of cuttings: 5 cm long (first and second nodal segment) and 10 cm long, in the 4 seasons. Aciculated branch propagules were removed from an adult matrix and were submitted to grafting and cutting, evaluating the habit of growth and morphology. In the evaluation of the production potential of *A. angustifolia* shoots, a cut was made above the grafted area and the number and height of the shoots were assessed every 30 days for 6 months, in two different matrices: Kaiová and Multiflora. In conclusion, cryopreservation is an alternative for the ex situ conservation of *P. lambertii*; The use of IBA has no influence on rooting of *P. lambertii*; The results show differences in the morphology of grafted and rooted *A. angustifolia* aciculated branches; cuttings of secondary branches remain alive after 11 years, with plagiotropic and creeping growth requiring tutoring. The number of shoots, height and diameter show the high propagules production capacity in a clonal forestry after six months of pruning.

Key-words: Pinheiro Bravo; Pinheiro do Paraná; Conservation; grafting; vegetative propagation.

LISTA DE FIGURAS

2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* (KLOTZSH EX ENDL)

FIGURA 2.1- CORTES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* NÃO CRIOPRESERVADAS (A) E QUE FORAM CRIOPRESERVADAS E SUBMETIDAS AO DESCONGELAMENTO RÁPIDO (B) E MODERADO (C). SETAS INDICAM O EIXO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES. BARRA = 100 μ M. 26

FIGURA 2.2 - VALORES MÉDIOS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* EM FUNÇÃO DAS UNIDADES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO. 27

FIGURA 2.3- PLÂNTULAS DE *Podocarpus lambertii* PROVENIENTES DE SEMENTES DESIDRATADAS E CRIOPRESERVADAS (A) E SEMENTES DESIDRATADAS E NÃO CRIOPRESERVADAS (B). BARRA= 5 CM 28

FIGURA 2.4- FOTOMICROGRAFIA DE GRÃOS DE AMIDOS NO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii*. SETAS INDICAM OS GRÃOS DE AMIDO. 29

FIGURA 2.5- FOTOMICROGRAFIA DO EMBRIÃO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii*. C= COTILÉDONES; E= EIXO EMBRIONÁRIO; R= RADÍCULA; G= GRÃO DE AMIDO NO ENDOSPERMA..... 30

FIGURA 2.6- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DAS SEMENTES DE *P. lambertii* (13%) E DESIDRATADAS (10 E 7%) E NÃO CRIOPRESERVADAS..... 32

FIGURA 2.7- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DURANTE 1 DIA..... 32

FIGURA 2.8- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DURANTE 60 DIAS. 33

FIGURA 2.9- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DURANTE 186 DIAS..... 33

3 ESTAQUIA DE *Podocarpus lambertii* KLOTZSH EX ENDL

FIGURA 3.1- TIPOS DE ESTACA DE *Podocarpus lambertii*. ESTACAS DE 10 CM (A); ESTACAS DO PRIMEIRO SEGMENTO (B) E DO SEGUNDO SEGMENTO (C). 43

4 MORFOGÊNESE DOS RAMOS SECUNDÁRIOS DA *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE APÓS PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

FIGURA 4.1 - ENXERTIA DE RAMO SECUNDÁRIO DE *A. angustifolia* POR PLACAGEM LENHOSA (A,B). DETALHE DA CICATRIZAÇÃO DO ENXERTO (C). CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO DOS ENXERTOS (D,E) COM DETALHE DO CALO FORMADO (D). CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO DO RAMO ENXERTADO, COM AUSÊNCIA DE RAMIFICAÇÕES (F). ENXERTOS COM TUTORAMENTO E SEM TUTORAMENTO (G). SENESCÊNCIA E MORTE DOS ENXERTOS APÓS CERCA DE 3-5 ANOS, TANTO ENXERTOS TUTORADOS (H) QUANTO NÃO TUTORADOS (I), INDICADOS POR FLECHAS PRETAS. FLECHAS BRANCAS INDICAM AS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO. FOTOS: FLAVIO ZANETTE. MONTAGEM DA PRANCHA: CRIZANE HACKBARTH..... 60

FIGURA 4.2- ESTACAS ENRAIZADAS DE RAMOS SECUNDÁRIOS DE *A. angustifolia* (A). ESTACAS COM TUTORAMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO (B). ESTACA COM CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO RENTE AO CHÃO, PLANTADA EM LOCAL DEFINITIVO, COM RAMIFICAÇÕES BILATERAIS ORGANIZADAS EM VERTICILLOS (C, J). ESTACA COM TUTORAMENTO, COM DETALHE DAS RAMIFICAÇÕES ORGANIZADAS EM VERTICILLOS (D,E). RAMIFICAÇÃO DO QUARTO VERTICILLO DA ESTACA EM SIMETRIA RADIAL (F). ENXERTO DE PROPÁGULO RETIRADO DA ESTACA DOS RAMOS SECUNDÁRIOS DE *A. ANGUSTIFOLIA* (G). CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO DO RAMO ENXERTADO, SEM TUTORAMENTO, E COM RAMIFICAÇÕES ORGANIZADAS NOS VERTICILLOS E SIMETRIA RADIAL (H,I). FOTOS: FLAVIO ZANETTE (A,B,C,D,E,F,G,H,I) E CAROLINE FRIZZO (J). MONTAGEM DA PRANCHA CRIZANE HACKBARTH..... 63

5 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BORBULHAS EM JARDIM CLONAL DE *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

FIGURA 5.1 – NÚMERO DE BROTAÇÕES POR PLANTA ENXERTADA DE *Araucaria angustifolia*..... 74

FIGURA 5.3 – ALTURA MENSAL MÉDIA DAS BROTAÇÕES DUAS VARIEDADES DE *Araucaria angustifolia* 75

FIGURA 5.2 - INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM PLANTAS ENXERTADAS DE *A. angustifolia*: (A) BROTAÇÕES AÓS 2 MESES; (B) AOS 3 MESES; (C) AOS 4 MESES; (D) AOS 6 MESES; (E) DOMINÂNCIA APICAL. BARRA = 5 cm. 76

FIGURA 5.4 - POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BORBULHAS POR PLANTA..... 78

LISTA DE TABELAS

2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* (KLOTZSH EX ENDL)

TABELA 2.1- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO RÁPIDO E MODERADO..... 24

TABELA 2.2- MEDIÇÕES DO COMPRIMENTO, LARGURA E ESPAÇO ENTRE O EMBRIÃO E O ENDOSPERMA DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO E OS TRATAMENTOS DE DESCONGELAMENTO RÁPIDO E MODERADO..... 25

TABELA 2.3- MÉDIA (%) E DESVIO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS NO ENDOSPERMA DE SEMENTES *Podocarpus lambertii* NÃO CRIOPRESERVADAS E CRIOPRESERVADAS. 30

TABELA 2.4 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS DO EMBRIÃO DAS SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* NÃO CRIOPRESERVADAS E CRIOPRESERVADAS. 31

3 ESTAQUIA DE *Podocarpus lambertii* KLOTZSH EX ENDL

TABELA 3.1 – PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DAS ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* APÓS 90 DIAS COLETADAS EM QUATRO ESTAÇÕES DO ANO. 45

TABELA 3.2 – PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO APÓS 90 DIAS. 46

TABELA 3.3 – NÚMERO DE RAIZES EM DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO. 46

TABELA 3.4 – COMPRIMENTO (CM) DA MAIOR RAIZ DE DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* APÓS 90 DIAS NAS ESTAÇÕES DO ANO. 47

TABELA 3.5 – PORCENTAGEM DE CALOGÊNESE EM DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO. 48

TABELA 3.6 – NÚMERO DE BROTAÇÕES EM DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO..... 48

5 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BORBULHAS EM JARDIM CLONAL DE *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

TABELA 5.1 – ALTURA, DIÂMETRO E NÚMERO DE BROTAÇÕES DAS DUAS VARIEDADES DE *Araucaria angustifolia* AOS 6 MESES..... 74

TABELA 5.2 – NÚMERO DE BROTAÇÕES EM PLANTAS ENXERTADAS NAS DIFERENTES CLASSES..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	- Ácido Indolbutírico
Al	- Alumínio
b.u	- Base úmida
Ca	- Cálcio
cm ³	- Centímetro cúbico
CO ₂	- Dióxido de Carbono
EDS	- Espectroscopia por Dispersão de Energia
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GEVA	- Grupo de Estudos para a Valorização da Araucária
IVG	- Índice de Velocidade de Germinação
K	- Potássio
m	- Metros
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	- Magnésio
mg.L ⁻¹	- Miligramas por litro
mL	- Mililitro
mm	- Milímetros
Na	- Sódio
NL	- Nitrogênio Líquido
P	- Fósforo
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
S	- Enxofre
SNK	- Student-Newman-Keuls
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
μL	- Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

Σ - Somatório de números

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Podocarpus lambertii</i> (KLOTZSH EX ENDL).....	17
	RESUMO	17
	CRYOPRESERVATION OF <i>Podocarpus lambertii</i> KLOTZSH EX ENDL SEEDS	17
	ABSTRACT	17
2.1	INTRODUÇÃO.....	18
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1	Experimento I	20
2.2.2	Experimento II	21
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.3.1	Experimento I	23
2.3.2	Experimento II	26
2.4	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
3	ESTAQUIA DE <i>Podocarpus lambertii</i> KLOTZSH EX ENDL	40
	RESUMO	40
	CUTTING OF <i>Podocarpus lambertii</i> KLOTZSH EX ENDL	40
	ABSTRACT	40
3.1	INTRODUÇÃO.....	41
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.4	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	50
4	MORFOGÊNESE DOS RAMOS SECUNDÁRIOS DA <i>Araucaria angustifolia</i> (BERTOL.) KUNTZE APÓS PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	54
	RESUMO	54

	MORPHOGENESIS OF THE SECONDARY BRANCHES OF <i>Araucaria angustifolia</i> (BERTOL.) KUNTZE AFTER VEGETATIVE PROPAGATION	55
	ABSTRACT	55
4.1	INTRODUÇÃO.....	55
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.2.1	Experimento I - Enxertia de grimpas por garfagem em porta-enxerto jovem	58
4.2.2	Experimento II - Enraizamento de grimpas da <i>A. angustifolia</i>	58
4.2.3	Experimento III - Enxertia propágulos retirados das grimpas enraizadas.....	58
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.3.1	Experimento I – Enxertia de grimpas.....	59
4.3.2	Experimento II – Estaquia de grimpas	62
4.3.3	Experimento III - Enxertia com propágulo de grimpas enraizadas	65
4.4	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
5	POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BORBULHAS EM JARDIM CLONAL DE <i>Araucaria angustifolia</i> (BERTOL.) KUNTZE	69
	RESUMO	69
	POTENTIAL FOR PRODUCTION OF BUDS IN CLONAL FORESTRY OF <i>Araucaria angustifolia</i> (BERTOL.) KUNTZE	69
	ABSTRACT	69
5.1	INTRODUÇÃO.....	70
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	72
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.4	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

No Brasil há duas famílias de coníferas nativas a Podocarpaceae e Araucariaceae (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2016). A família Podocarpaceae é representada por oito espécies *Podocarpus lambertii*, *P. selowii*, *P. brasiliensis*, *P. acuminatus*, *P. aracensis*, *P. barretoj*, *P. celatus* e *P. roraimae* (JARDIM BOTANICO DO RIO DE JANEIRO, 2016). A *Araucaria angustifolia* é a única espécie da família Araucariaceae com ocorrência natural no Brasil (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2016; PELISSARI et al., 2016; ZANETTE et al., 2017).

O *P. lambertii* e a *A. angustifolia* são espécies encontradas nos estados do Sul e algumas regiões do Sudeste do Brasil, originárias da Floresta Ombrófila Mista, conhecida como Floresta de Araucária (INOUE et al., 1984; MARAN et al., 2016; ZANETTE et al., 2017).

Durante o processo de ocupação da região Sul do Brasil, expressiva exploração antrópica foi desferida sobre as áreas de Floresta Ombrófila Mista, resultando em intensa supressão de madeiras e substituição da vegetação natural por pastagens e culturas agrícolas (PELISSARI et al., 2016; ZANETTE et al., 2017). Devido à intensa exploração desta floresta, estima-se que restam aproximadamente 2% de sua área original (MARAN et al., 2016; ZANETTE et al., 2017).

O gênero *Podocarpus* é considerado o único gênero tropical das Coniferales no Hemisfério Sul, e o *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endlicher, um dos representantes deste gênero, é conhecido popularmente como pinheiro-bravo, pertencendo à família Podocarpaceae (CARVALHO, 2004; COSTA; BOSCARDIN, 2014). Ocorre naturalmente desde o estado da Bahia e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (COSTA; BOSCARDIN, 2014; MARINHO et al., 2016). É uma das espécies que compõe a Floresta Ombrófila Mista e Ombrófila Densa (Mata Atlântica) (GARCIA et al. 2006; COSTA; BOSCARDIN, 2014).

O *P. lambertii* é uma árvore de porte pequeno em formações abertas, porém de grande porte nas florestas do sul do país (CARVALHO, 2004, MARINHO et al., 2016). Apresenta grande importância ambiental por atrair pássaros que dispersam suas sementes e promovem a regeneração natural da espécie (GARCIA; NOGUEIRA, 2008). Sua madeira tem emprego similar ao da araucária, podendo

ser usada na forma de tábuas para forros, caixaaria, marcenaria, compensados, laminados, aglomerados, instrumentos musicais entre outros (INOUE et al., 1984; CARVALHO, 2004).

As sementes de *P. lambertii* possuem comportamento ortodoxo (GARCIA; NOGUEIRA, 2008). A propagação do *P. lambertii* ocorre geralmente por sementes (CARVALHO, 2004; GARCIA; NOGUEIRA, 2008), a definição da época ideal da colheita, a disponibilidade de sementes em quantidade e qualidade e a heterogeneidade do material vegetal, são fatores que dificultam sua propagação (FERRARI, 2004; SIMÃO et al., 2007; DIAS et al., 2012; DIAS et al., 2015).

Existem duas estratégias básicas de conservação: *in situ* e *ex situ* (LI; PRITCHARD, 2009; ENGELMANN; GONZÁLEZ-ARNAO, 2013). A conservação *ex situ* foi proposta como medida de prevenção contra o processo de erosão genética, no entanto, são necessárias técnicas para conservação a longo prazo do germoplasma com a máxima integridade genética e biológica possível (ENGELMANN, 2011; CRUZ-CRUZ et al., 2013).

A técnica de criopreservação vem ganhando destaque por ser a forma mais adequada para a conservação de sementes a longo prazo (10 a 100 anos), uma vez que mantém as características genéticas do material criopreservado a -196°C (ENGELMANN, 2000; PRITCHARD; NADARAJAN, 2008; ENGELMANN; GONZÁLEZ-ARNAO, 2013; GONZALEZ-ARNAO et al., 2014).

A propagação vegetativa é uma alternativa à propagação por sementes, no entanto, não há um protocolo eficiente para o *P. lambertii*. A definição de um método eficiente permitirá a multiplicação em larga escala de matrizes selecionadas para fins comerciais e auxiliará no resgate e conservação da espécie, tal como recomendado por Dias et al. (2015) para espécies florestais.

Conhecida popularmente como araucária, pinheiro brasileiro ou pinheiro do Paraná, *A. angustifolia* (Bert.) O. Ktze é a gimnosperma nativa de maior importância econômica do Brasil (GUERRA et al., 2002). Pertence a mata de araucária que originalmente cobria grandes áreas contínuas na Região Sul, estendendo-se para São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo na forma de pequenas manchas isoladas, principalmente nas regiões mais frias e altas destes estados (ZANETTE et al., 2017).

A exploração da *A. angustifolia* foi inicialmente focada em sua madeira, principalmente entre 1930 e 1970 (DANNER et al., 2012). A madeira serrada e

laminada foi, por um longo período, um dos produtos mais importantes na exportação brasileira devido a sua alta qualidade, coloração amarelada, macia, leve e lisa (ANSELMINI, 2005). Apresenta boas características físicas e mecânicas em relação à massa específica, é indicada para construções em geral (como caixotaria, móveis, laminados, tábuas para forro, ripas, palitos de fósforo e lápis). Pode ser utilizada na produção de papel de alta qualidade e a resina proveniente da casca serve para fabricação de vernizes, terebintina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos (INOUE et al., 1984; MAINIERI; CHIMELO, 1989; ANSELMINI, 2005; MATTOS et al., 2006). Suas sementes (pinhões) servem como uma fonte alimentar para animais, mas também é muito apreciada pelo homem, sendo uma rica fonte de energia (ANSELMINI, 2005).

Plantas da família Aracauriaceae possuem um pólo meristemático na axila de cada acícula capaz de se diferenciar quando livre da dominância apical (IRITANI et al., 1992; BURROWS, 2002; WENDLING et al., 2017). Esse tipo de dominância tem sido explorada em trabalhos de propagação por enxertia em araucária, principalmente quando se utiliza borbúlia por placagem (WENDLING, 2015; CONSTANTINO; ZANETTE, 2015). Nesse caso, o propágulo de interesse é mantido na planta até que haja a soldadura, logo após é feito a remoção do ápice dessa planta removendo, portanto, a dominância apical e consequentemente estimulando a brotação do enxerto. Apesar da importância da dominância no processo de enxertia, pouco se sabe sobre seus efeitos no desenvolvimento de brotações em jardins clonais voltados para produção de propágulos.

A espécie apresenta polimorfismo de ramos, característica marcante de todas as plantas da família Araucariaceae. De acordo com Carvalho et al. (1950), este fenômeno se caracteriza por uma diferenciação somática permanente. Portanto, como a copa da araucária é constituída predominantemente por ramos plagiotrópicos, o principal problema é a dificuldade de obtenção de brotações com hábito de crescimento ortotrópico (ZANETTE et al., 2011; WENDLING et al., 2017).

Zobel e Talbert (1984) relataram que quando enxertados propágulos de origem plagiotrópica, as brotações assumem crescimento desviado da vertical e crescem de forma similar a um ramo lateral. Este fenômeno já tinha sido detectado por Gurgel e Gurgel Filho (1967) trabalhando com a enxertia em *A. angustifolia*. Os autores notaram diferenças no crescimento de enxertos realizados com ramos ortotrópicos e plagiotrópicos. De acordo com Wendling et al. (2009), Zanette et al.

(2011) e Constantino e Zanette (2015), apenas propágulos de origem ortotrópica desenvolvem copa normal, portanto são os indicados para o resgate e multiplicação da araucária.

Considerando as particularidades de ambas as espécies (*P. lambertii* e *A. angustifolia*), os objetivos gerais foram: avaliar as sementes de *P. lambertii* submetidas à criopreservação e compreender os aspectos da propagação vegetativa do *P. lambertii* e *A. angustifolia*. Consequentemente, os objetivos específicos foram: avaliar o tamanho, a anatomia, a germinação e a composição química das sementes de *P. lambertii* após a desidratação, criopreservação e descongelamento; Desenvolver uma metodologia para a propagação vegetativa do pinheiro bravo via estaquia, avaliando o efeito do AIB em diferentes tamanhos de estaca e nas estações do ano; Descrever o comportamento morfológico e o tropismo dos ramos secundários de *A. angustifolia* propagados por enxertia e estaquia e avaliar as brotações de matrizes enxertadas de *A. angustifolia* mantidas em jardim clonal, após poda.

2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* (KLOTZSH EX ENDL)

RESUMO

Podocarpus lambertii, conhecido como pinheiro bravo é uma gimnosperma nativa da região Sul do Brasil e devido à intensa exploração da Mata Atlântica é uma espécie em risco de extinção. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tamanho, a anatomia, composição química e germinação das sementes de *P. lambertii* após a desidratação, criopreservação e descongelamento. Foi determinado o teor de água inicial das sementes, e as mesmas foram desidratadas e imersas em nitrogênio líquido durante vários períodos e descongeladas de duas maneiras: rápida, em banho maria a 37°C durante três minutos, e lenta, a temperatura ambiente durante 30 minutos. A fim de avaliar a composição das sementes foram realizadas análises de microscopia de varredura (MEV), espectroscopia por dispersão de energia (EDS) e ressonância magnética nuclear (RMN). A porcentagem de germinação foi de até 71% para sementes desidratadas e criopreservadas. Houve diferença no tamanho do embrião para as sementes descongeladas pelo método rápido quando comparado com a testemunha e o descongelamento rápido. O endosperma das sementes de *P. lambertii* contém amido e no eixo embrionário Ca, P, S, Al, Na, Mg e K. Nas análises (RMN) foram encontrados ácidos graxos saturados e insaturados em sementes de *P. lambertii*. A criopreservação é uma alternativa para a conservação *ex situ* de sementes e as mesmas toleram a desidratação e o armazenamento em NL em até 186 dias sem perder a viabilidade.

Palavra-chave: Pinheiro bravo; conservação; germoplasma; nitrogênio líquido;

CRYOPRESERVATION OF *Podocarpus lambertii* (KLOTZSH EX ENDL) SEEDS

ABSTRACT

Podocarpus lambertii, known as “pinheiro-bravo”, is a gymnosperm native to the southern region of Brazil and due to the intense exploitation of the Atlantic Forest is a species threatened with extinction. The objective of this work was to evaluate the size, anatomy, germination and chemical composition of *Podocarpus lambertii*

seeds after dehydration, cryopreservation and thawing. The initial moisture contents of the seeds were determined; subsequently they were dehydrated and immersed in liquid nitrogen for several periods and thawed in two ways: fast, in a water bath at 37° C for three minutes, and slow, at room temperature for 30 minutes. In order to evaluate seed composition, scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and nuclear magnetic resonance (NMR) analyzes were performed. The germination percentage was up to 71% for dehydrated and cryopreserved seeds. There was a difference in the size of the embryo for the seeds thawed by the fast method when compared to the control and the rapid thawing. The endosperm of *P. lambertii* seeds contains starch, and the embryonic axis contains Ca, P, S, Al, Na, Mg and K. In the NMR analyzes, saturated and unsaturated fatty acids were found in *P. lambertii* seeds. Cryopreservation is an alternative for the *ex situ* conservation of seeds and they tolerate dehydration and LN storage for up to 186 days without losing viability.

Key words: Pinheiro-bravo; conservation; germplasm; Liquid nitrogen.

2.1 INTRODUÇÃO

Podocarpus lambertii, popularmente conhecido por pinheiro bravo, pertence à família Podocarpaceae e é encontrado na Região Sul e Sudeste do Brasil. Originário da Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), o pinheiro bravo têm valor comprovado para plantios florestais, caracterizando-se pela facilidade de regeneração natural por atrair os pássaros e propiciando assim a dispersão das sementes (GARCIA; NOGUEIRA, 2008). Com relação ao uso da madeira, a espécie pode ser empregada da mesma forma que a *Araucaria angustifolia* (INOUE et al., 1984; CARVALHO, 2004; GARCIA; NOGUEIRA, 2008). O desmatamento e a exploração desordenada levaram a uma drástica redução da Mata de Araucárias tornando o *P. lambertii* ameaçada de extinção (RAGAGNIN et al., 1994; IUCN, 2013).

As sementes das espécies vegetais são divididas em dois grandes grupos: no primeiro estão às espécies ortodoxas e no segundo as recalcitrantes, considerando a capacidade de suas sementes suportarem a dessecação no final do desenvolvimento e posterior armazenamento (ROBERTS, 1973). As sementes

de *P. lambertii* possuem comportamento ortodoxo (GARCIA; NOGUEIRA, 2008). No entanto Siqueira e Ferreira (1987) concluíram que as sementes de pinheiro bravo possuem elevado conteúdo de água quando coletadas e perdem a viabilidade quando armazenadas em sala de laboratório. Medeiros e Zanon (1998) armazenaram em câmara fria e em embalagem semipermeável sementes de *Podocarpus lambertii* e ocorreu o decréscimo na germinação.

Existem duas estratégias básicas de conservação: *in situ* e *ex situ* (LI; PRITCHARD, 2009; ENGELMANN; GONZÁLEZ-ARNAO, 2013). Conservação *ex situ* é a manutenção de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, em coleções de plantas no campo, banco de genes, armazenamento de sementes e coleções *in vitro* em condições limitadas de crescimento, e a criopreservação (LI; PRITCHARD, 2009; CRUZ-CRUZ et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015). A conservação de germoplasma *ex situ* foi proposta como medida de prevenção contra o processo de erosão genética, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas para conservação a longo prazo do germoplasma de espécies vegetais com as máximas integridades genética e biológica possíveis (ENGELMANN, 2011; CRUZ-CRUZ et al., 2013).

A técnica de criopreservação, a qual consiste no congelamento de tecidos vegetais a temperatura de -196°C , é a forma mais adequada para a conservação de sementes de espécies recalcitrantes e tem sido empregada também na conservação de sementes ortodoxas por longo prazo (até 100 anos) (ENGELMANN, 2000; PRITCHARD; NADARAJAN, 2008; ENGELMANN; GONZÁLEZ-ARNAO, 2013; GONZALEZ-ARNAO et al., 2014). Assim, a criopreservação é proposta como uma técnica favorável e segura para a preservação de germoplasma e prevenção de sua deterioração (STANWOOD, 1985; ENGELMANN; GONZÁLEZ-ARNAO, 2013; BÁRBARA et al., 2015). Segundo Fonseca et al. (2012), em um banco de germoplasma a baixas temperaturas, não só o processo de criopreservação deve ser levado em consideração, mas também o método de descongelamento, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas (MAZUR, 1984; MOLINA et al., 2006; GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2014; PUKACKI; JUSZCZYK, 2015).

O stress causado pelo congelamento e descongelamento nas células, pode resultar na formação de radicais livres que levam a desnaturação de proteínas e mutações no DNA (KACZMARCZYK et al., 2012; BERJAK; PAMMENTER, 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tamanho, a anatomia, o teor elementar e germinação das sementes de pinheiro bravo (*P. lambertii*) após a criopreservação e descongelamento e analisar a tolerância das sementes submetidas à diminuição do teor de umidade em relação a diferentes tempos de criopreservação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *P. lambertii* foram colhidas no mês de janeiro na área da Embrapa Florestas no município de Colombo, Estado do Paraná. O teor de água das sementes foi determinado no início dos experimentos, pelo método de estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, utilizando três repetições com 10 sementes (BRASIL, 2009).

Na desinfestação foi utilizado o fungicida Cercobin na quantidade de 2 g L^{-1} adicionado água correspondente a 5% do peso médio das sementes. As sementes foram colocadas em pote de vidro e agitadas com a solução fungicida durante cinco minutos.

2.2.1 Experimento I

As sementes foram colocadas em criotubos de 2 mL, imersas diretamente em nitrogênio líquido e após 24 horas foram testados dois métodos de descongelamento: rápido, a 37°C durante três minutos, e moderado, a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Após o descongelamento, as sementes foram colocadas para germinar sobre papel mata borrão umedecido e levadas para a BOD à 25°C , com fotoperíodo de 16 horas/dia, sendo a duração do teste de 60 dias, conforme recomendado nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O vigor das sementes foi avaliado pelo índice de velocidade de germinação (IVG), simultaneamente ao teste de germinação, de acordo com o proposto por Maguire (1962), sendo empregada a seguinte fórmula:

$$IVG = \sum \frac{ni}{di}$$

Em que: ni = número de sementes germinadas; di = dias transcorridos desde a semeadura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com o uso do software estatístico Assistat® (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Para a realização dos estudos morfológicos e anatômicos as sementes descongeladas e não congeladas foram fixadas em solução de Karnovsky (1964) modificado, por quatro semanas a 4° C, submetidas à desidratação progressiva em série etílica (10, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 95%) e emblocadas em historresina Leica®, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram efetuadas secções longitudinais de 18 µm de espessura, obtidas em micrótomo rotatório, e a coloração foi efetuada com azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN et al., 1964). A montagem das lâminas permanentes foi realizada com resina sintética e os registros fotográficos e medições foram efetuados em microscópio fotônico Zeiss.

2.2.2 Experimento II

Após a determinação do teor de umidade inicial (13%), as sementes remanescentes foram submetidas à desidratação em estufa, para a atingir 10 e 7% de umidade.

No processo de secagem das sementes as amostras foram colocadas em uma estufa, com temperatura ajustada para $33 \pm 3^\circ\text{C}$ e pesadas a cada 1 hora, até alcançar os pesos referentes aos teores de água desejados. A perda de água pelas sementes foi determinada pela equação abaixo, recomendada pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

$$Pf = Pi \left(\frac{100 - T_{Ai}}{100 - T_{Af}} \right)$$

Em que: Pf = peso final da amostra em gramas; Pi = peso inicial da amostra em gramas; T_{Ai} = teor de água inicial das sementes (b.u), % e T_{Af} = teor de água desejada das sementes (b.u),%.

Após a desidratação as sementes foram criopreservadas pelo método de congelamento rápido, consistindo na imersão direta em NL (nitrogênio líquido). As mesmas foram colocadas em embalagens de alumínio, com 50 sementes cada. As embalagens de ambos os tratamentos permaneceram por diversos períodos de tempo (1, 60 e 186 dias) criopreservadas em NL. Após a criopreservação as sementes foram descongeladas pelo método rápido, a 37°C durante três minutos em banho Maria, conforme o capítulo 1.

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento inicial, após o descongelamento rápido, as sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor com substrato comercial em estufa climatizada.

Para a análise elementar foi retirado cerca de 2/3 do tegumento das sementes de *Podocarpus lambertii* e em seguida as mesmas foram fixadas em solução de Karnovsky (1964) modificação, por quatro semanas a 4°C, submetidas à desidratação progressiva em série etílica (10, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 99%). Na região central do embrião foi realizado um corte central (com lâmina de aço inoxidável) e em seguida a desidratação ao ponto crítico com CO₂ líquido. Após as amostras foram montadas em suportes (stubs) de alumínio fixados com fita dupla-face de cobre e recobertos por ouro.

As microanálises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, utilizando microscópio eletrônico de varredura (Vega3 LM, Tescan) com espectroscópio de energia dispersiva (X-MaxN 80 mm², Oxford). Foram selecionados três pontos do embrião (radícula, hipocótilo e cotilédone) e determinada a composição elementar. As imagens foram obtidas com voltagem acelerada de 15 kV em baixo vácuo. As microanálises por EDS foram realizadas com voltagem acelerada de 15 kV e em tempo 120 s por ponto.

Para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H foram utilizadas as sementes inteiras, os quais foram pulverizadas com o auxílio de nitrogênio líquido. Para cada análise, cerca de 10 mg de amostra foram utilizados para preencher o rotor de 50 µL (porta-amostra). Para homogeneizar a amostra adicionou-se 35 µL de CDCl₃ contendo 0,05% de γTMS (tetrametilsilano).

A obtenção dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H foi registrada em um espectrômetro de RMN (Bruker AVANCE 400), operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400.13 MHz, equipado com uma sonda de alta resolução

com giro no ângulo mágico trinuclear (^1H , ^{13}C e ^{15}N) de observação direta de 4 mm e gradiente de campo no eixo na direção do ângulo mágico.

As condições utilizadas para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H consistiu em: sequência de pulso zgpr com tempo de relaxação (D1) de 20,0 s, 64 K de número de pontos (TD), 32 transientes (NS), janela espectral de 5592,841Hz, tempo de aquisição igual (AQ) a 5,9 s que resultam em um tempo de análise de 13 min 48 s. Durante a aquisição as amostras foram giradas no ângulo mágico ($\theta = 54,74^\circ$) a uma velocidade de 5 KHz e a temperatura mantida em 25 °C. O ângulo mágico foi ajustado no início das análises e o shimming foi otimizado para cada amostra. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do TMS (δ 0,0 ppm).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Experimento I

O teor de água nas sementes no momento de instalação do experimento foi de 10,7%, o que as caracteriza como sementes ortodoxas, isto é, sementes que toleram a desidratação (ROBERTS, 1973). Diniz et al., (1999) e Fonseca et al. (2012), relataram que o valor máximo tolerável de umidade para criopreservação seria de 9%, em base úmida. Goldfarb et al. (2008, 2010) trabalhando com sementes criopreservadas de pinhão manso, secas e reidratadas para teores de água entre 4 e 14% e descongeladas gradativamente, relataram que com o congelamento das sementes com teores de água entre 4 e 8% a qualidade fisiológica foi mantida. Desta forma, o baixo teor de umidade nas sementes de *P. lambertii*, muito próximo do encontrado por Goldfarb (2008, 2010), permite a aplicação da técnica de criopreservação sem a necessidade de utilização de crioprotetores ou desidratação das sementes, portando reduzindo os custos.

Um ponto crítico na criopreservação de sementes ortodoxas é definir o teor de água ideal antes da criopreservação (SANTOS, 2001; TOWILL, 2002; CHMIELARZ, 2009; FONSECA et al., 2012). Caso os teores sejam muito baixos pode ocorrer desidratação excessiva e a morte das células, enquanto que teores elevados levam à formação de cristais de gelo no interior das células, resultando na ruptura do sistema de membranas celulares e à perda da permeabilidade seletiva

das células e da compartimentalização celular, culminando no colapso e morte celular (AGUIAR et al., 2012; FONSECA et al., 2012).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a porcentagem de germinação e vigor (TABELA 2.1), indicando que nem o teor de água das sementes ou a velocidade de descongelamento influenciaram fisiologicamente na germinação das sementes. Trabalhando com outra espécie de conífera (*Pinus elliotti*) Fonseca et al. (2012) também não encontraram diferença entre os tratamentos quando estudaram o descongelamento rápido e moderado, desta forma o descongelamento rápido em banho Maria pode ser uma alternativa pela rapidez e praticidade.

TABELA 2.1- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO RÁPIDO E MODERADO.

Tratamento	Germinação (%)	IVG
Testemunha	64 a	0.02727 a
Rápido	65 a	0.02707 a
Moderado	59 a	0.02462 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Testemunha= sementes não criopreservadas; Rápido= sementes descongeladas pelo método rápido; Moderado= sementes descongeladas pelo método moderado.

Durante o descongelamento moderado pode ocorrer a formação de cristais de gelo, como relatado por Diniz et al. (1999) e Molina et al. (2006), que durante o descongelamento das sementes, o método de descongelamento lento (temperatura ambiente) se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade de ocorrer um recongelamento durante este período. A recristalização da água pode ser evitada pelo descongelamento rápido de amostras em banho maria a 35 a 45°C (LAMBARDI et al., 2008). Reed e Uchendu (2008), Berjak e Pammenter (2014) também afirmaram que o rápido descongelamento impede a recristalização da água dentro das células das plantas. Michalak et al. (2015) relataram que sementes de *Populus nigra* L. sobreviveram à criopreservação após o descongelamento rápido a 40°C durante cinco minutos. Assim, conforme confirmado nesse estudo, o descongelamento rápido é melhor uma vez que pode evitar a formação de cristais de gelo e consequentemente a morte celular.

O estudo anatômico comparativo dos embriões das sementes revelou que o tratamento com descongelamento rápido apresentou diferença em relação às sementes que não foram criopreservadas (TABELA 2.2 FIGURA 2.1). Esta diferença pode estar relacionada com o citoesqueleto das células. De acordo com Pammenter e Berjak (1999), os principais componentes do citoesqueleto são microtúbulos e microfilamentos, que fornecem um suporte interno para as células, bem como a imposição de organização no citoplasma e núcleo. Em sementes ortodoxas, a remontagem ordenada de elementos do citoesqueleto deve acompanhar a reidratação, a incapacidade para restabelecer o apoio intracelular e organização estrutural fornecida pelo citoesqueleto seria obviamente um fator danoso na reidratação de sementes sensíveis a reidratação (PAMMENTER; BERJAK, 1999). A falha do citoesqueleto para se reorganizar após a desidratação prejudicialmente ao baixo conteúdo de água poderia ser fisiológica, bem como consequências estruturais nas células de tecidos de sementes sensíveis a desidratação (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

TABELA 2.2- MEDIÇÕES DO COMPRIMENTO, LARGURA E ESPAÇO ENTRE O EMBRIÃO E O ENDOSPERMA DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO E OS TRATAMENTOS DE DESCONGELAMENTO RÁPIDO E MODERADO.

Tratamento	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Espaço (μm)
Testemunha	1220,409 a	576,646 a	56,839a
Rápido	1213,184 b	575,854 b	62,971 b
Moderado	1091,193 c	523,425 c	120,086 c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. . Testemunha= sementes não criopreservadas; Rápido= sementes descongeladas pelo método rápido; Moderado= sementes descongeladas pelo método moderado.

Berjak e Pammenter (2014) comentam que métodos mais rápidos de descongelamento se adaptam melhor à criopreservação, pois métodos lentos possibilitam o recongelamento das sementes (DINIZ et al.,1999; MOLINA et al., 2006). Santos (1999) ressalta que na maioria dos casos descongelamento rápido por imersão em água ou meio de cultura líquido a 35 - 40°C tem garantido melhores resultados. Nesta faixa de temperatura o descongelamento é rápido o bastante para evitar a fusão de micro-cristais formados no congelamento ou a formação de novos cristais pela água liberada (SANTOS, 1999; BERJAK; PAMMENTER, 2014).

FIGURA 2.1- CORTES LONGITUDINAIS DE EMBRIÕES DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* NÃO CRIOPRESERVADAS (A) E QUE FORAM CRIOPRESERVADAS E SUBMETIDAS AO DESCONGELAMENTO RÁPIDO (B) E MODERADO (C). SETAS INDICAM O EIXO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES. BARRA = 100 μ M.

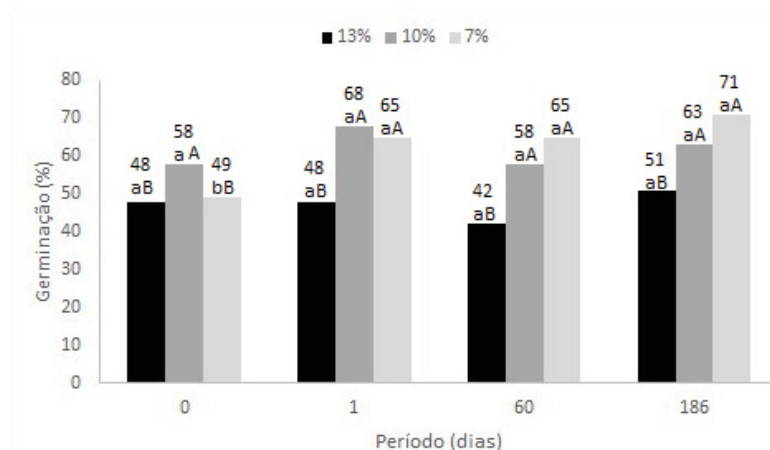


2.3.2 Experimento II

O teor de água inicial nas sementes de *Podocarpus lambertii* foi de 13% base úmida, que foi o teor encontrado quando as sementes foram coletadas. Como houve interação entre a desidratação e os tempos de criopreservação, foi feito o desdobramento dos dados. Os resultados da análise de variância para a germinação indicam efeito significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste de F, para o fator de teor de umidade durante a criopreservação.

Observa-se que a porcentagem de germinação para os teores de umidade não obteve diferença estatística em comparação aos tempos de criopreservação. Apenas as sementes desidratadas a 7% e não criopreservadas apresentaram diferença estatística (FIGURA 2.2). Towill (2002) e Fonseca et al. (2012) discorrem que o ponto mais crítico na criopreservação de sementes ortodoxas é definir o teor de água ideal antes da imersão em nitrogênio líquido, teores muito baixos, podem levar à desidratação excessiva e a morte das células e uma taxa elevada de umidade levaria à formação de cristais de gelo no interior das células, resultando na ruptura do sistema de membranas celulares e na morte celular. Aguiar et al. (2012) e Fonseca et al. (2012) ainda ressaltam que teores elevados afetam a permeabilidade seletiva das células e a compartimentalização celular, culminando no colapso e morte celular.

FIGURA 2.2 - VALORES MÉDIOS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* EM FUNÇÃO DAS UMIDADES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO.



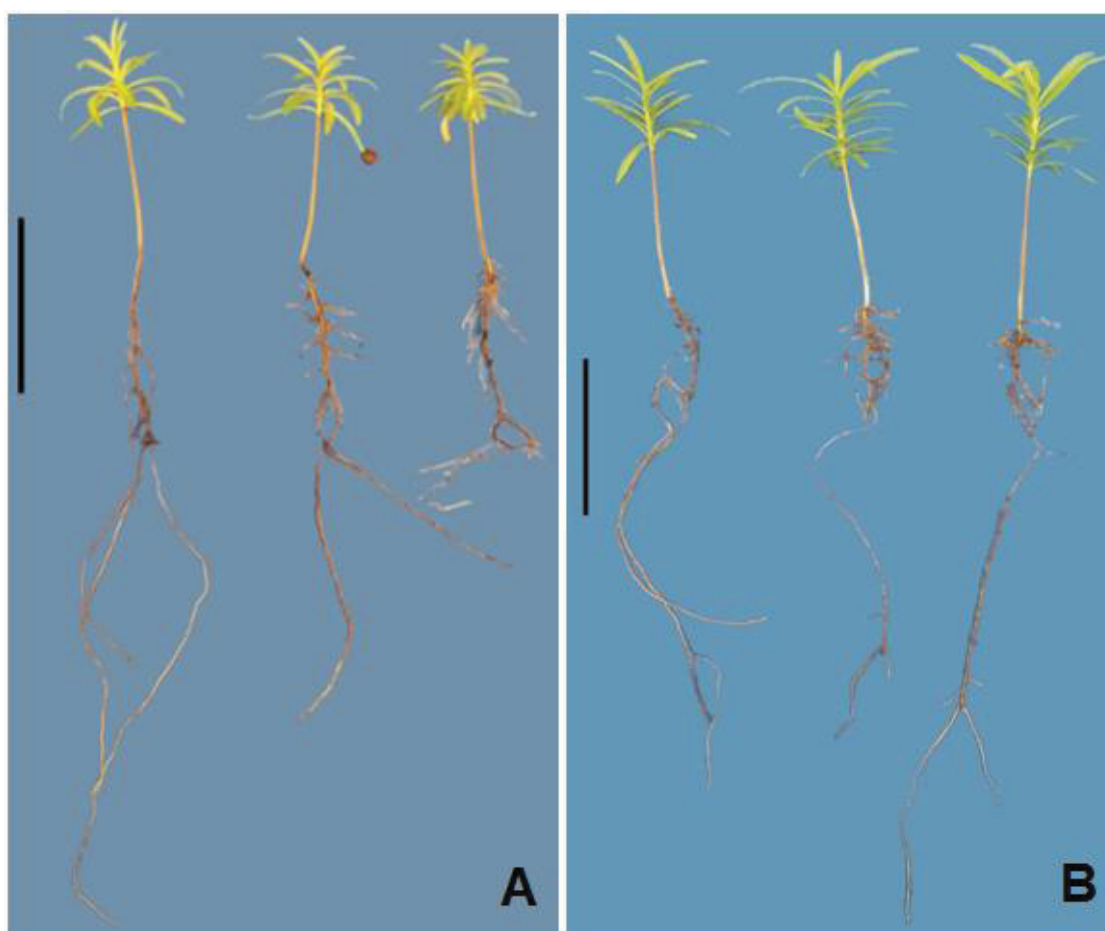
*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula entre os períodos e maiúscula entre os teores, não diferem entre si a 1%, pelo teste de Tukey.

Para os diferentes teores de água das sementes, não ocorreu diferença significativa para a criopreservação nos diferentes tempos (1, 60 e 186 dias). Com isso entende-se que a criopreservação é viável como um método para a conservação das sementes de *P. lambertii* não importando o tempo de desidratação ou criopreservação até os 186 dias. Conforme a FIGURA 3.1, sementes desidratadas a 10 e 7% de umidade apresentaram maior percentual de germinação independente do tempo de criopreservação. Para as sementes que não foram criopreservadas e desidratadas a 10% de umidade, também não apresentaram diferença estatística quando comparado às sementes que não foram desidratadas e foram criopreservadas. Ou seja, desta forma é viável a desidratação das sementes para a criopreservação. A utilização do nitrogênio líquido como um meio de armazenamento supõe que as sementes resistam à exposição sem sofrer danos maiores à sua viabilidade, e para isso, o teor de água da semente é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da criopreservação, pois se o conteúdo de água da semente for muito alto, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e/ou descongelamento (OSPINA et al., 2000).

Não foram encontradas diferenças no desenvolvimento de plantas oriundas de sementes criopreservadas e não criopreservadas, indicando que a criopreservação não afetou o desenvolvimento das mesmas (FIGURA 2.3). Segundo Carvalho (2004) as sementes de *Podocarpus lambertii* apresentam um percentual de germinação de no máximo 60%. Neste trabalho, foi alcançado até 71% de germinação nas sementes que foram desidratadas a 7% e criopreservadas

durante 186 dias. Os tratamentos de criopreservação proporcionaram as sementes maiores taxas de germinação quando comparado a testemunha. Possivelmente houve a ruptura do tegumento das sementes durante a criopreservação e o descongelamento rápido, permitindo assim a quebra da dormência tegumentar e possibilitando a germinação das sementes.

FIGURA 2.3- PLÂNTULAS DE *Podocarpus lambertii* PROVENIENTES DE SEMENTES DESIDRATADAS E CRIOPRESERVADAS (A) E SEMENTES DESIDRATADAS E NÃO CRIOPRESERVADAS (B). BARRA= 5 CM

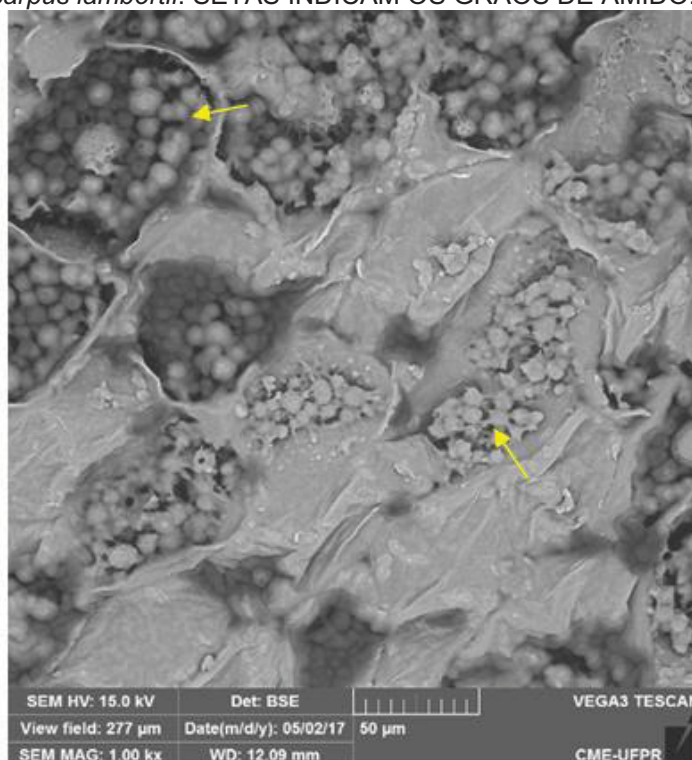


Para o sucesso da criopreservação é importante evitar o congelamento intracelular que ocorre durante o resfriamento rápido em nitrogênio líquido. Tecidos vegetais que precisam ser preservados devem ser suficientemente desidratados para evitar a formação de gelo intracelular e, portanto, vitrificar após resfriamento rápido em nitrogênio líquido (SINGH et al., 2015). Um dos fatores críticos para a criopreservação é a formação de cristais de gelo que podem causar danos irreversíveis (SANTOS, 2001). Isso pode ser uma explicação para o tratamento

uma vez que as sementes criopreservadas com 13% de umidade obtiveram a menor porcentagem de germinação. Marcos Filho (2005) relata que para o armazenamento de sementes ortodoxas, o conteúdo de água intracelular deve estar entre 10 a 12% enquanto que para Bewley e Black (1986) são recomendados percentuais entre 8 e 9%. Ferrari et al. (2016) comenta que a criopreservação de sementes ortodoxas pode ser atingida com sucesso quando contenham naturalmente, baixos teores de água intracelular. Um baixo conteúdo de água intracelular é desejado para que a criopreservação ocorra com sucesso em materiais vegetais (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011).

Na análise de microscopia eletrônica de sementes de *P. lambertii*, foram encontrados grãos de amido no endosperma (FIGURA 2.4 e FIGURA 2.5). O amido é considerado a principal substância de armazenamento no endosperma das sementes, servindo de fonte primária de carboidratos durante a germinação e crescimento de plântulas (PAN et al., 2018).

FIGURA 2.4- FOTOMICROGRAFIA DE GRÃOS DE AMIDOS NO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii*. SETAS INDICAM OS GRÃOS DE AMIDO.



No endosperma das sementes foi observado os seguintes compostos: cálcio (Ca), enxofre (S), alumínio (Al) e sódio (Na). Não foi observado diferença na

concentração desses elementos no endosperma das sementes criopreservadas e não criopreservadas, conforme a TABELA 2.3.

TABELA 2.3- MÉDIA (%) E DESVIO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS NO ENDOSPERMA DE SEMENTES *Podocarpus lambertii* NÃO CRIOPRESERVADAS E CRIOPRESERVADAS.

ENDOSPERMA	%	Ca	S	Al	Na
Não criopreservadas	Média	0,43	0,10	0,10	0,10
	Desvio Padrão	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001
Criopreservadas	Média	0,43	0,10	0,00	0,10
	Desvio Padrão	0,0005	0,0002	0,0002	0,0001

Ca= cálcio; S= enxofre; Al= alumínio e Na= sódio.

Não foram identificados danos no embrião das sementes e no eixo embrionário (FIGURA 2.5). Foi encontrado no embrião os seguintes compostos: cálcio (Ca), fósforo (P), enxofre (S), alumínio (Al), sódio (Na), magnésio (Mg) e potássio (K) (TABELA 2.4). De acordo com Jacob Neto e Rossetto (1998), para os macronutrientes como N, P, Ca e Mg é pouco provável que só a reserva interna da semente seja suficiente para a planta complementar seu ciclo. Isto ocorre devido a maior necessidade quantitativa destes elementos para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

FIGURA 2.5- FOTOMICROGRAFIA DO EMBRIÃO DE SEMENTES DE *Podocarpus lambertii*. C= COTILÉDONES; E= EIXO EMBRIONÁRIO; R= RADÍCULA; G= GRÃO DE AMIDO NO ENDOSPERMA.

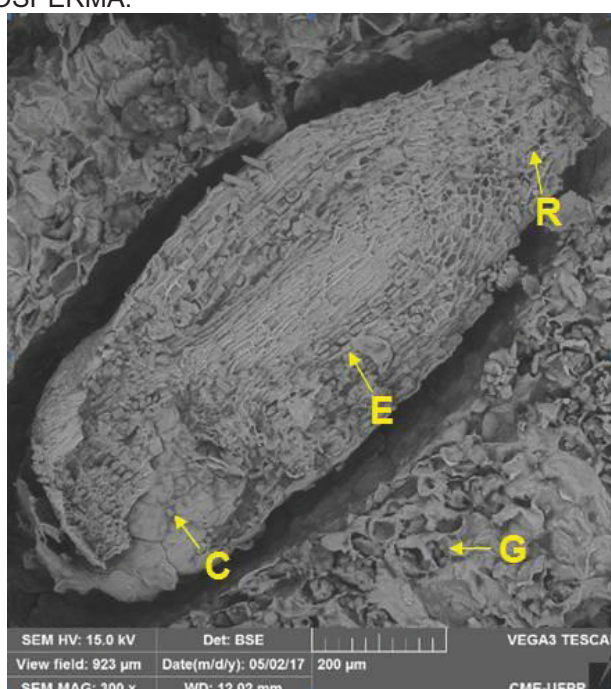


TABELA 2.4- MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS DO EMBRIÃO DAS SEMENTES DE *Podocarpus lambertii* NÃO CRIOPRESERVADAS E CRIOPRESERVADAS.

Teor de umidade (%)	Tempo de Criopreservação (dias)	%	Ca	P	S	Al	Mg	K	Na
13	0	Média	0,20	-	-	0,10	-	-	0,20
		D P	0,00	-	-	-	-	-	0,00
13	1	Média	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	-	0,10
		D P	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	0,00
13	60	Média	0,80	0,77	0,43	0,27	0,35	0,15	0,13
		D P	0,65	0,61	0,30	0,15	0,07	0,07	0,06
13	186	Média	1,40	0,23	0,40	0,40	0,10	0,20	0,10
		D P	0,69	0,11	0,17	0,17	-	0,10	-
10	0	Média	0,27	0,17	0,10	0,37	0,20	-	0,17
		D P	0,11	0,11	0,00	0,11	-	-	0,06
10	1	Média	0,57	0,63	0,20	0,40	0,30	0,10	-
		D P	0,63	0,66	0,17	-	0,17	-	-
10	60	Média	1,40	1,63	0,47	0,50	0,60	0,10	0,10
		D P	0,17	0,20	0,11	0,17	0,10	0,00	-
10	186	Média	0,20	0,23	0,10	-	0,17	-	-
		D P	0,00	0,06	0,00	-	0,05	-	-
7	0	Média	0,43	0,10	0,10	0,10	-	-	0,13
		D P	0,05	0,00	0,00	0,00	-	-	0,06
7	1	Média	0,30	0,13	0,10	0,10	0,10	-	0,13
		D P	0,17	0,06	0,00	-	-	-	0,06
7	60	Média	1,23	1,30	0,83	0,30	0,40	0,20	0,20
		D P	0,38	0,56	0,30	0,10	0,17	0,00	0,00
7	186	Média	0,20	0,37	0,23	-	0,23	0,10	0,10
		D P	0,00	0,11	0,05	-	0,06	-	-

DP: Desvio Padrão; Cálcio (Ca), Fósforo (P), Enxofre (S), Alumínio (Al), Sódio (Na), Magnésio (Mg) e Potássio (K),

Analisando os espectros de RMN HR-MAS de ^1H das diferentes amostras de sementes de *Podocarpus lambertii* foi possível observar sinais característicos da presença de ácidos graxos saturados e insaturados (ácido linoleico, ácido oléico, ácido linolênico), conforme encontrou Barison et al. (2010). Porém para confirmar visando uma melhor exatidão é necessário aumentar o número de amostras. Além disso, foi possível observar que existe grande similaridade espectral tanto entre as sementes não criopreservadas (FIGURA 2.6) quanto aquelas criopreservadas por 1, 60 e 186 dias (FIGURA 2.7, 2.8, 2.9 respectivamente), indicando que a desidratação e os vários tempos de criopreservação não afetaram significativamente na composição química das amostras de *Podocarpus lambertii*.

FIGURA 2.6- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DAS SEMENTES DE *P. lambertii* (13%) E DESIDRATADAS (10 E 7%) E NÃO CRIOPRESERVADAS.

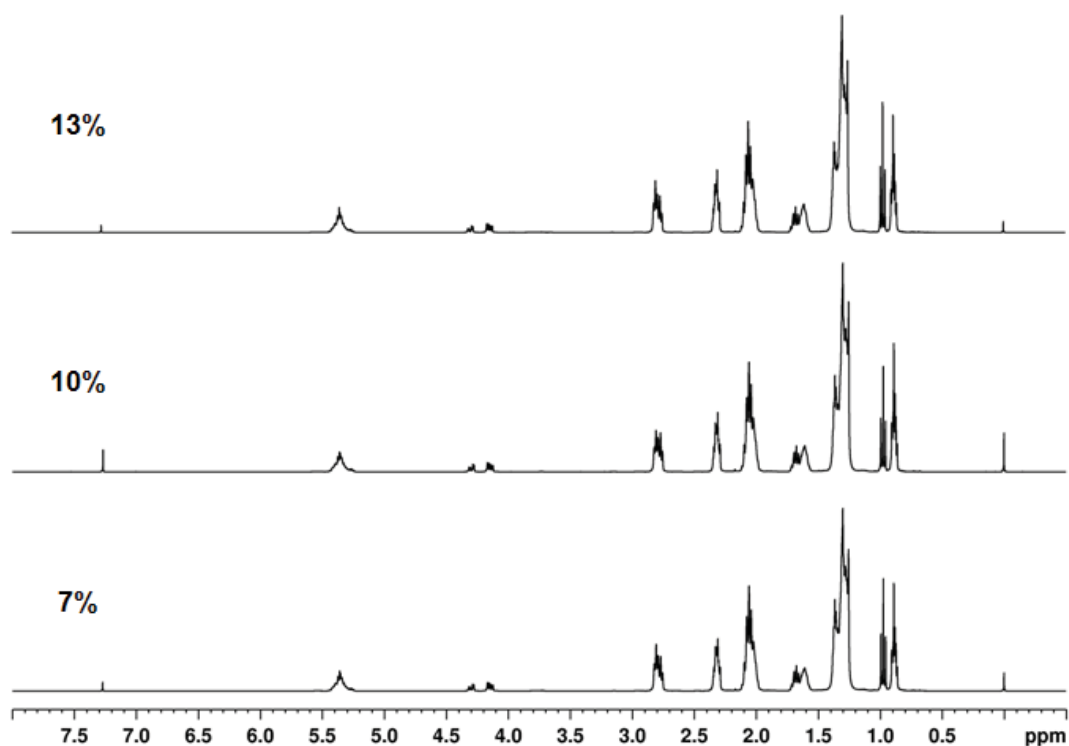


FIGURA 2.7- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DURANTE 1 DIA.

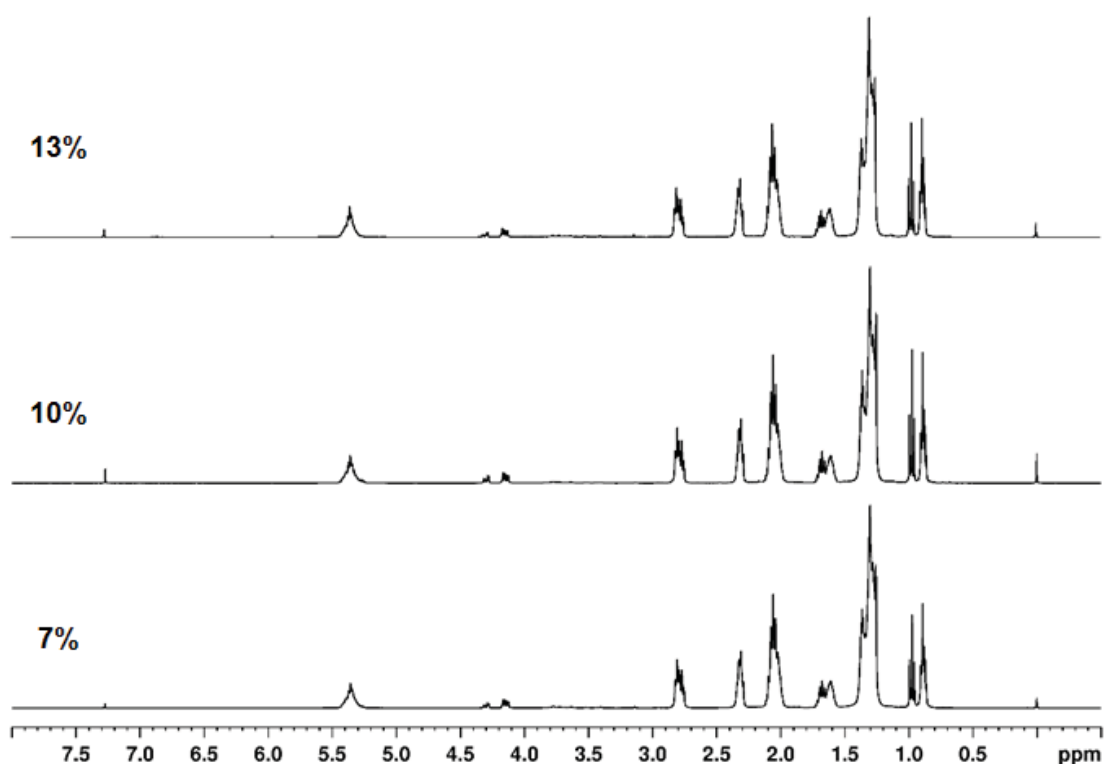


FIGURA 2.8- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DURANTE 60 DIAS.

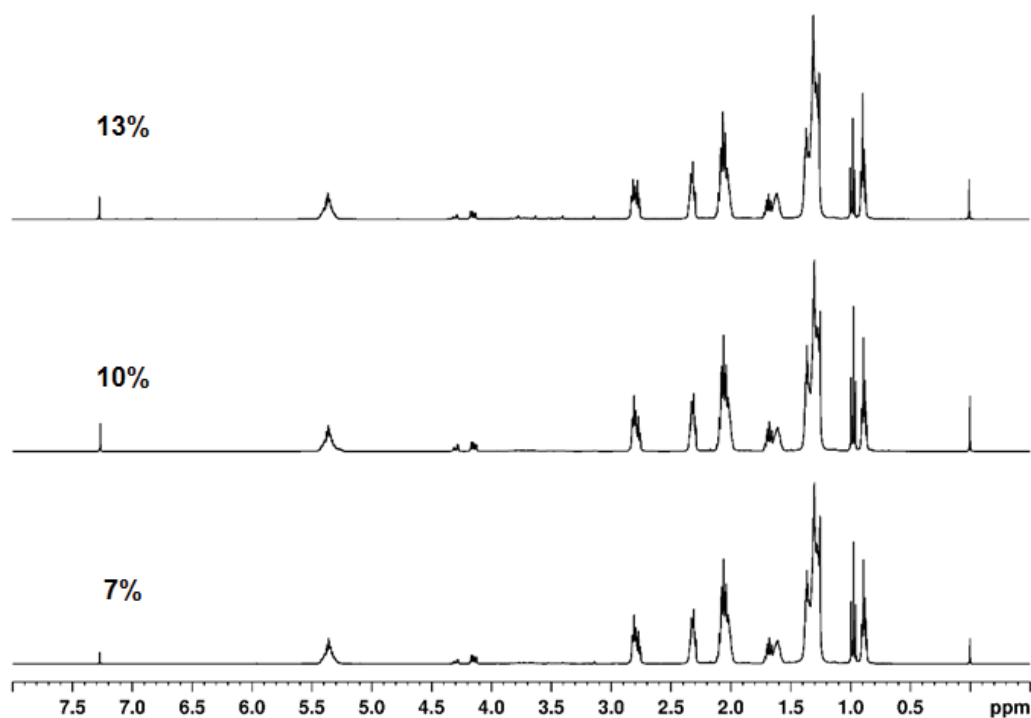
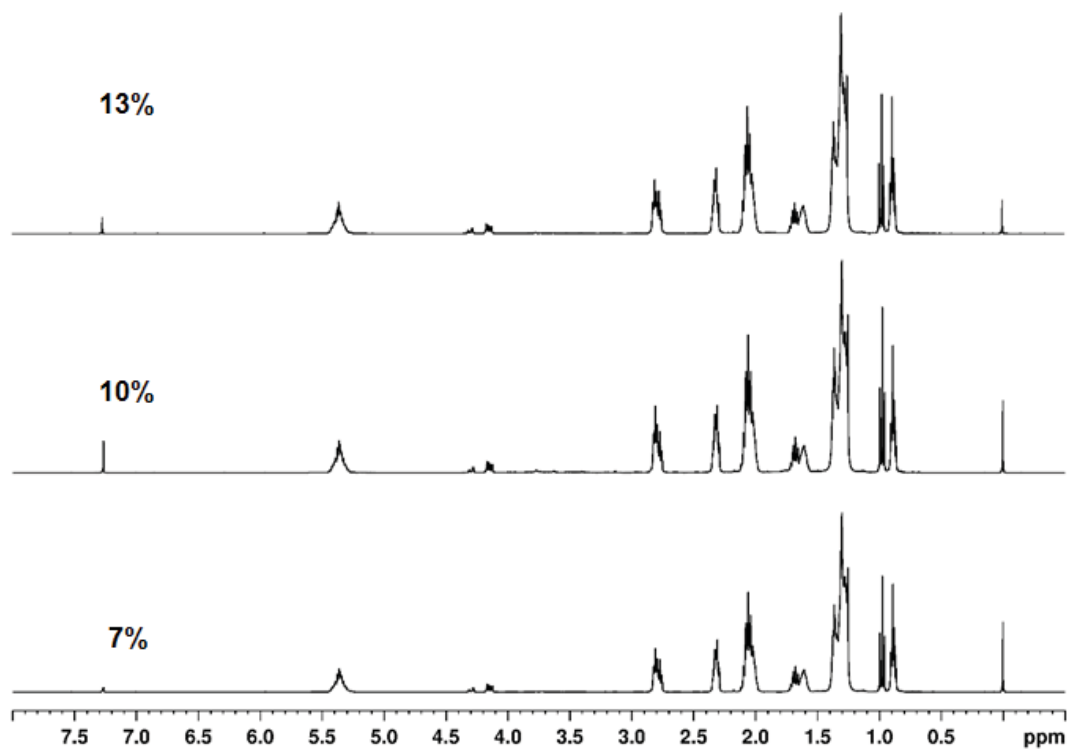


FIGURA 2.9- ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE SEMENTES CRIOPRESERVADAS DURANTE 186 DIAS.



De acordo com Tillman-Sutela e Kauppi (1995) e Wajs-Bonikowska et al. (2016), os ácidos graxos são componentes principais da estrutura da membrana celular e são importantes para alguns processos biológicos vitais, tanto nas plantas quanto nos seres humanos. Os ácidos graxos, geralmente presentes em triglicerídeos em sementes de coníferas, ocorrem principalmente no endosperma primário do gametófito feminino e, portanto, sua principal função é servir como fonte de energia para o embrião (WAJS-BONIKOWSKA et al., 2016). Desta forma podemos concluir que o armazenamento de sementes ortodoxas com reduzido teor de água possibilita a manutenção da viabilidade dos materiais biológicos por mais tempo, uma vez que a taxa respiratória será reduzida (NASCIMENTO, 2009; FARIA, 2016). Segundo Panis e Lambardi (2006) e Kaviani (2011) a criopreservação de sementes ortodoxas é feita após desidratação seguida de armazenamento em nitrogênio líquido.

Pesquisas na área de criobiologia vêm se destacando no cenário mundial com o objetivo de compreender os mecanismos biológicos envolvidos em todas as etapas da conservação. Entretanto, diante da diversidade de respostas entre as diferentes espécies vegetais, torna-se cada vez mais revelante a realização de pesquisas para o estabelecimento de protocolos de criopreservação.

2.4 CONCLUSÃO

- A criopreservação é uma alternativa na conservação *ex situ* das sementes de *Podocarpus lambertii*.
- Os tratamentos de descongelamento rápido e moderado não afetaram a qualidade fisiológica das sementes de *Podocarpus lambertii*.
- O descongelamento moderado afetou a estrutura anatômica de embriões de sementes de *Podocarpus lambertii*.
- As sementes de *Podocarpus lambertii* toleram a desidratação (7% de umidade) e o armazenamento em nitrogênio líquido em até 186 dias sem perder a viabilidade.
- As sementes de *Podocarpus lambertii* contém amido, ácidos graxos saturados e insaturados, cálcio (Ca), fósforo (P), enxofre (S), alumínio (Al), sódio (Na), magnésio (Mg) e potássio (K).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T.D.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; TELES, C.H.A.; MARTINS, G.R.; BEZERRA, R.Q.J.; COSTA, E.C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p. 80-93, 2012.

BÁRBARA, E.P.S.; SILVA, A.A.; SOUZA, M.M.O.R.; GURGEL, Z.E.R.; MARCHI, M.N.G.; BELLINTANI, M.C. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia**, v.9, n.2, p. 91-96. 2015;

BARISON, A.; SILVA, C.W.P.; CAMPOS, F.R.; SIMONELLI, F.; LENZ, C.A.; FERREIRA, A.G. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance In Chemistry**, p.1-9, 29 jun. 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.2629>.

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: A practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 15-32.

BERJAK, P; PAMMENTER, N.W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: approaches and problems. **International Journal of Plant Science**, v.175, n. 1, p.29–39, 2014;

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1986. 445 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009; 399p.

CARVALHO, P.E.R. Pinheiro bravo (*Podocarpus lambertii*). Circular técnica - 95 Embrapa Florestas, 2004.

CHMIELARZ, P. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.). **Annals of Forest Science**, v.66, n.4, p.405–405, 2009.

CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**, v.2, p.73-95, 2013.

DINIZ, P.S.C.; MATA, M.E.R.M.C.; BRAGA, M.E.D. Influência das técnicas de descongelamento na qualidade fisiológica nas sementes de milho crioconservadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.1, n.1, p.1-12, 1999.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, In: ENGELMANN, F. AND TAKAGI, X. editors. **Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and**

application. Japan International. Center for Agricultural Sciences, Japan and International Plant Genetic Resources Institute. Roma, Italy, 2000.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.47, n.1, p.5-16, 2011.

ENGELMANN, F.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T. Introduccion a La conservacion *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. In: ENGELMANN, F.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T. editors. **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; 2013.

FARIA, C.V.N.R.P.; FREITAS, R.T.; FIGUEIREDO, J.R.M.; SILVA, D.P.C.; REIS, M.V. Criopreservação de sementes de *Physalis angulata* L. por meio da desidratação em sílica gel. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.12, n.2, p.27-33, 2016.

FERRARI, E. A. P. et al. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n.1, p.172-177, 2016.

FONSECA, A.G.; MATUDA, J.J.M.; ALMEIDA, J.O.; NUNES, U.R.; MACHADO, E.L.M. Qualidade fisiológica de sementes de *Pinus elliotti* Engelm submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **Cerne**, v.18, n.3, 2012.

GARCIA, L.C.; NOGUEIRA, A.C. Resposta de sementes de *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus sellowii* – (Podocarpaceae) à dessecação. **Ciência Florestal**, v.18, n.3, p.347-352, 2008.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v.23, n.1, p. 27-33, 2010.

GOLDFARB, M.; MARTINS, M.E.D.; MATA, M.E.R.M.; PIMENTEL, L.W.; SEVERINO, L.S.S. Teor de água limite para crioconservação das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.10, n.2, p. 121-129, 2008.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; MARTINEZ-MONTERO, M.E.; CRUZ-CRUZ, C.A.; ENGELMANN, F. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity. In: AHUJA, M.R. e RAMAWAT, K.G. editors. **Biotechnology and Biodiversity**, Development and Biodiversity; 2014.

INOUE, M.T.; RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S.; **Projeto madeira do Paraná**. Fundação de pesquisas florestais do Paraná. Curitiba; 1984.

IUCN Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T34086A2844519.en> . Dados de **12 de setembro de 2016**.

KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; PHANG, P.Y.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; MANCERA, R.L. **Current Issues in Plant Cryopreservation**. In: Katkov, I. editor. InTech; 2012.

KALAISELVI, R.; RAJASEKAR, M.; GOMATHI, S. Cryopreservation of plant materials- A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 5, p. 560-564, 2017.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n.6, p.778- 800, 2011.

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, A.E.; BENELLI, C. Cryopreservation of Embryogenic Cultures. In: Reed, BM editor. **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide**. New York, USA: Spinge; 2008.

LI, D.Z.; PRITCHARD, H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v.14, n.11, p.614-621, 2009.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology-Cell Physiology**, v.247, p.125–142, 1984.

MEDEIROS, A.C.S.; ZANON, A. Conservação de sementes de Branquilha (*Sebastiania commersoniana* (Baillon) LB Smith & RJ Down.) e de pinheiro-bravo (*Podocarpus lambertii* Klotzch ex endl.) armazenadas em diferentes ambientes. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v.36, p.57-69, 1998.

MICHALAK, M.; PLITTA, B.P.; TYLKOWSKI, T.; CHMIELARZ, P.; SUSZKA, J. Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe. **European Journal of Forest Research**, v.134, p.53–60, 2015.

MOLINA, T.F.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p. 72-81, 2006.

NASCIMENTO, J.P.B.; VIEIRA, D.C.M.; MEIADO, M.V. *Ex situ* seed conservation of brazilian cacti. **Gaia scientia**, v.9, n.2, p.111-116, 2015.

NASCIMENTO, W. M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. 432 p.

O'BRIEN, TP; FEDER, N; MCCULLY, ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OSPINA, J.A.; GUEVARA, C.L.; CAICEDO, L.E.; BARNEY, V. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F. and TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm – Posters**. Japan International Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 384-388, 2000.

PAN, T.; LIN, L.; WANG, J.; LIU, Q.; WEI, C.; Long branch-chains of amylopectin with B-type crystallinity in rice seed with inhibition of starch branching enzyme I and IIb resist in situ degradation and inhibit plant growth during seedling development. **Bmc Plant Biology**, v.18, n.1, p.1-11, 8 jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-017-1219-8>

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The Role of Biotechnology**, v.5, n.7, p.43-54, 2006.

PRITCHARD, HW; NADARAJAN, J. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. In: Reed, BM editor. **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide**. New York, USA: Springer; 2008.

PUKACKI, P.M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two Acer species. **Trees**, v.29, p.385–396, 2015.

RAGAGNIN, L.I.M.; COSTAS, E.C.; HOPPE, J.M. Maturidade fisiológica de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotzsch. **Ciência Florestal**, v.4, n.1, p.23-41, 1994.

REED, M; UCHENDU, E. Controlled Rate Cooling. In: Reed, BM editor. **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide**. New York, USA: Springer; 2008.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499- 514, 1973.

SANTOS, I. R. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo.. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p.60-65, mai/jun 2001.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1999.

SILVA, F.A.Z.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2009.

SILVA, F.A.Z.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2009.

SINGH, N. Principles and procedures for long-term conservation of orthodox seeds. In: Jacob S.R, Singh, N.; Srinivasan, K.; Gupta, V.; Radhamani, J.; Kak, A.;

Pandey, C.; Pandey, S.; Aravind, J.; Bisht, I.S.; Tyagi, RK. (eds). **Management of Plant Genetic Resources**, 2015, cap. 19, p. 159-162.

SIQUEIRA, V.L.; FERREIRA, A.G. Germinação de sementes de *Podocarpus lambertii* Kl.: Características qualitativas e quantitativas. **Iheringia**, Porto Alegre, n.36, p.57-63, 1987.

STANWOOD, PC. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Kartha KK editor. **Cryopreservation of plant cells and organs**. CRC, Boca Raton, Florida; 1985, p.199-226.

TILLMAN-SUTELA, E.; KAUPPI, A. The morphological background to imbibition in seeds of *Pinus sylvestris* L. of different provenances. **Trees**, vol. 9, n.3, p.123–133, fev. 1995.

TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. In: Towill, LE, Bajaj, YPS editors. **Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry**, 50. Berlin, 2002;

WAJS-BONIKOWSKA, A.; SMEDS, A.; WILLFÖR, S. Chemical composition and content of lipophilic seed extractives of some *Abies* and *Picea* species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 9, p.1194-1201, set. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600014>.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v.242, n.2, p.397–406, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>.

3 ESTAQUIA DE *Podocarpus lambertii* KLOTZSH EX ENDL

RESUMO

A propagação vegetativa por estaquia pode ser uma alternativa à propagação sexuada, possibilitando a clonagem de genótipos superiores e a conservação de recursos genéticos florestais. Para a propagação de *P. lambertii* não foram encontrados na literatura trabalhos abordando a propagação vegetativa via estaquia. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a propagação vegetativa do pinheiro bravo (*P. lambertii*) via estaquia, avaliando o efeito do AIB em diferentes tamanhos de estaca e nas estações do ano. O experimento foi conduzido em casa de vegetação. Foram testadas 4 concentrações de AIB (0, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹) e três tipos de estacas: estaca de 5 cm (primeiro e segundo segmento nodal) e estaca de 10 cm de comprimento. Compondo assim, um fatorial de 3 (tipos de estaca) x 5 (concentrações) x 4 (épocas), com 5 repetições de 10 estacas cada. A época de coleta e o tipo de estacas influenciaram no enraizamento. A primavera é a estação mais indicada para propagação do *P. lambertii* usando, preferencialmente, estacas obtidas do primeiro segmento nodal.

Palavra-chave: Tipo de Estacas; Enraizamento; Auxina; AIB;

CUTTINGS OF *Podocarpus lambertii* KLOTZSH EX ENDL

ABSTRACT

Vegetative propagation by cuttings may be an alternative to sexual propagation, making possible the cloning of superior genotypes and the conservation of forest genetic resources. For the propagation of *P. lambertii*, no studies on vegetative propagation by cuttings were found in the literature. Thus, the objective of this work was to develop a methodology for the vegetative propagation of pinheiro-bravo (*P. lambertii*) by cuttings, evaluating the effect of IBA on different cuttings sizes and seasons. The experiment was conducted in greenhouse. Four concentrations of IBA (0, 500, 1000 and 2000 mg L⁻¹) and three types of cuttings: 5 cm cuttings (first and

second nodal segment) and 10 cm cuttings, composing a factor of 3 (types of cutting) \times 5 (concentrations) \times 4 (seasons), with 5 repetitions of 10 cuttings each. Both season of collection and type of cuttings influenced on the rooting. Spring is the most suitable season for propagation of *P. lambertii* using, preferably, cuttings obtained from the first nodal segment.

Key words: Type of cuttings; Rooting; Auxin; IBA.

3.1 INTRODUÇÃO

O *Podocarpus lambertii* conhecido como pinheiro bravo é considerado o único gênero tropical das Coniferales no Hemisfério Sul (COSTA; BOSCARDIN, 2014). É uma espécie nativa, endêmica da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias) (CARVALHO, 2004) e devido à intensa exploração desta floresta, o *P. lambertii* está ameaçado de extinção, segundo a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2013). É uma espécie dióica que pode atingir 27 m de altura e 1,20 m de diâmetro, os indivíduos jovens apresentam tronco reto e copa cônica. A germinação das sementes é epígea, com início entre 19 a 80 dias após a semeadura, alcançando no máximo 60% (CARVALHO, 2004).

A propagação do *P. lambertii* ocorre geralmente por sementes (sexuada). A maioria dos estudos é sobre a propagação sexuada de espécies, pela própria ausência de informações silviculturais das espécies, pelo maior domínio operacional e menores custos iniciais dessa técnica (RAGAGNIN et al., 1994; DIAS et al., 2012). Vários fatores dificultam a propagação sexuada de espécies florestais em viveiros, como a definição da época ideal da colheita das sementes, a disponibilidade de sementes em quantidade e qualidade e a heterogeneidade do material vegetal (FERRARI, 2004; SIMÃO et al., 2007; DIAS et al., 2012; DIAS et al., 2015). Neste caso, a propagação do pinheiro bravo por semente pode resultar em mudas desuniformes.

A ausência de um método eficiente de propagação vegetativa da espécie pode ser, ainda, uma limitação para o melhoramento genético, e, para tal, a implementação da técnica de estaquia poderá vir a ser decisiva para auxiliar na propagação da espécie (DIAS et al., 2015). A propagação por meio da estaquia é largamente reconhecida como método viável economicamente para o

estabelecimento de plantios clonais, podendo ser utilizadas para fins comerciais, assim como auxiliar no resgate e conservação de recursos genéticos florestais (DIAS et al., 2015).

Entre os fatores que influenciam o processo de propagação vegetativa, aplicações de reguladores de crescimento têm possibilitado o enraizamento de estacas (BRONDANI et al., 2008; DIAS et al., 2015). As auxinas são fitorreguladores e normalmente são consideradas as principais substâncias indutoras do enraizamento adventício, principalmente em espécies de difícil enraizamento (DIAS et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013; PONTES FILHO et al., 2014). Dentre as auxinas, a mais utilizada para o enraizamento adventício e a que tem apresentado melhores resultados para a maioria das espécies florestais é o ácido indol-3-butírico, conhecido como AIB (WENDLING et al., 2005; VALMORBIDA et al., 2008; DIAS et al., 2012). Ademais, o tipo da estaca utilizada também pode afetar a indução de raízes nas plantas, devido à existência de uma variação fisiológica ao longo do ramo, onde estacas provenientes de diferentes porções do mesmo ramo tendem a diferir quanto ao enraizamento (FACHINELLO et al., 2005; DIAS et al., 2015). O comprimento da estaca pode influenciar tanto nas reservas de carboidratos como no volume de auxinas endógenas, o que proporciona maior sobrevivência, emissão mais rápida de raízes e, afeta o número e tamanho das brotações produzidas durante o crescimento inicial (BRAGA et al., 2006; PONTES FILHO et al., 2014).

Para o *P. lambertii*, não foram encontrados na literatura trabalhos abordando a propagação vegetativa via estaquia, de forma que a definição deste protocolo em viveiro constitui uma demanda promissora para a produção de mudas da espécie, contribuindo sobremaneira para consolidar a base de uma silvicultura clonal para fins comerciais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a propagação vegetativa do pinheiro bravo (*Podocarpus lambertii*) via estaquia, avaliando o efeito do AIB em diferentes tipos de estacas e nas quatro estações do ano.

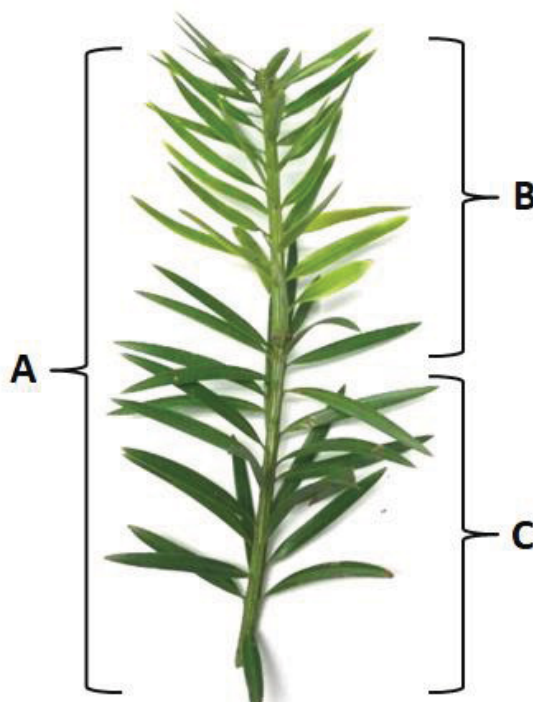
3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetativo de *Podocarpus lambertii* (Klotzsh ex Endl), foi coletado no município de Colombo PR Brasil, sob as coordenadas 25°15'06.5" de latitude Sul e 49°09'26.8" de longitude Oeste, 883 m de altitude.

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba – PR. O material vegetativo utilizado consistiu de ramos oriundos de 5 plantas matrizes com mais de 30 anos e uma altura média de 10 metros, as quais estavam a campo e não receberam nenhum trato cultural como adubação.

O material foi coletado nos meses de fevereiro (verão), maio (outono), agosto (inverno) e novembro (primavera) do ano de 2017. A partir destes ramos foram confeccionadas estacas caulinares semi lenhosas variando entre 10 – 13 cm de comprimento e estacas semi lenhosas com 5 cm de comprimento do primeiro e segundo segmento caulinar (FIGURA 3.1). O corte foi feito em bisel na base e corte reto no ápice, sendo mantidas quatro folhas na porção apical. Após a confecção, estas foram submetidas à desinfestação em hipoclorito de sódio a 0,5% durante 5 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes com água.

FIGURA 3.1- TIPOS DE ESTACA DE *Podocarpus lambertii*. ESTACAS DE 10 CM (A); ESTACAS DO PRIMEIRO SEGMENTO (B) E DO SEGUNDO SEGMENTO (C).



Foram testados 5 tratamentos: 0 (água destilada), 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e uma solução hidroalcoólica. Após as estacas foram plantadas em tubetes de polipropileno com capacidade de 53 cm³, contendo vermiculita de granulometria fina.

O experimento, em todas as estações do ano, foi conduzido em casa de vegetação climatizada com nebulização intermitente. Após 90 dias da instalação dos experimentos, em cada estação do ano, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, porcentagem de estacas enraizadas (estacas vivas que apresentaram raízes de, no mínimo 1 mm de comprimento, podendo ou não apresentar calos); estacas com calos (vivas, sem raízes com formação de massa celular indiferenciada na base); tamanho da maior raiz; número de raízes; estacas com brotações (estacas que formaram novas brotações no ápice).

Os dados foram avaliados como DIC com arranjo fatorial de 3 (tipos de estacas) x 5 (concentrações) x 4 (épocas), com 5 repetições de 10 estacas cada. Devido às particularidades deste experimento as variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância. As variáveis dos tratamentos se mostraram homogêneas, e foram submetidas à análise de variância e, quando apresentaram diferenças significativas pelo teste F, tiveram suas médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de 5% de probabilidade, e seus dados expressos em porcentagem, utilizando o software estatístico R.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve a interação entre época de coleta e tipo de estaca, para a sobrevivência das estacas de *Podocarpus lambertii* aos 90 dias. A melhor estação para a sobrevivência das estacas de *Podocarpus lambertii* foi observada no outono com 86,4% (TABELA 3.1). A porcentagem de sobrevivência foi diferente para os tipos de estacas no inverno e na primavera, aquelas com 5 cm do primeiro e segundo segmento obtiveram diferenças significativas, quando comparadas com as estacas de 10 cm (TABELA 3.1). Essa taxa de sobrevivência pode ser resultado das boas condições climáticas durante a realização do experimento e também da

boa capacidade da espécie em sobreviver após a confecção das estacas (NAVROSKI, 2015). Gerding et al. (1996) estudando a propagação vegetativa de *Podocarpus nibigena* alcançaram de 93 – 100% de sobrevivência das estacas após 4 meses.

TABELA 3.1 – PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DAS ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* APÓS 90 DIAS COLETADAS EM QUATRO ESTAÇÕES DO ANO.

ÉPOCA	TIPO DE ESTACA								
	10 cm			2 segmento (5 cm)			1 segmento (5 cm)		
Verão	47,6	b	A	57,2	c	A	47,2	c	A
Outono	85,6	a	A	86,4	a	A	78,4	a	A
Inverno	48,0	b	B	59,6	c	A	61,2	b	A
Primavera	25,6	c	B	73,6	b	A	71,6	ab	A

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5%, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Para as concentrações de AIB utilizadas houve diferença estatística, com a maior porcentagem de sobrevivência para as estacas do primeiro e segundo segmento, obtendo uma média de 70,0% quando foram avaliadas aos 90 dias. Esse resultado demonstra que a aplicação de auxina exógena pode elevar a porcentagem de sobrevivência em estacas de *Podocarpus lambertii*. Porém a aplicação de AIB não apresentou diferença estatística para o número de raízes e tamanho da maior raiz em estacas de *Podocarpus lambertii*. Por outro lado Gerding et al. (1996) estudando a propagação vegetativa de *Podocarpus nibigena* alcançaram entre 20 e 87% de enraizamento, sem a utilização de auxina.

Ocorreu baixa porcentagem de enraizamento (inferior a 35%) nas estacas de *Podocarpus lambertii* quando avaliadas aos 90 dias (TABELA 3.2). Para a porcentagem de enraizamento houve a interação entre os fatores tamanho da estaca e época de coleta. A época com maior porcentagem de enraizamento foi na primavera com estacas do primeiro segmento atingindo 34,8% de enraizamento aos 90 dias (TABELA 3.2). Provavelmente este resultado foi devido às características mais herbáceas deste tipo de estacas quando comparado àquelas do segundo segmento.

O melhor tratamento para o número de raízes foi na primavera para as estacas do primeiro segmento e no outono, com 10 cm de comprimento (TABELA 3.3), as estacas estavam com baixo enraizamento (TABELA 3.2). Para as concentrações de AIB utilizadas não houve efeito significativo, somente a época e tamanho de estaca. Os reguladores de crescimento nem sempre garantem uma

boa resposta na formação de raízes, pois as raízes são sensíveis a essas substâncias (ALVARENGA; CARVALHO, 1983; DIAS, 1999; BOTIN; CARVALHO 2015). Segundo Botin e Carvalho (2015) a utilização de reguladores vegetais busca aprimorar quantitativamente e qualitativamente a produção de mudas em um curto espaço de tempo. Os mesmo autores relatam que fatores endógenos como: juvenilidade, nutrição mineral e aplicação de reguladores, bem como os exógenos: umidade do ar, temperatura, luminosidade e a disponibilidade hídrica podem afetar diretamente o sucesso da propagação vegetativa. Outros trabalhos com *Podocarpus lawrencei* utilizando o ácido indolacético (AIA) o enraizamento das estacas foi alcançado após 4 meses (KHAN, 1968).

TABELA 3.2 – PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO APÓS 90 DIAS.

ÉPOCA	TIPO DE ESTACA								
	10 cm			2 segmento (5cm)			1 segmento (5cm)		
Verão	5,6	b	A	0,0	b	A	0,0	c	A
Outono	29,6	a	A	4,8	ab	C	12,8	b	B
Inverno	6,0	b	A	8,0	a	A	12,8	b	A
Primavera	3,6	b	B	7,6	a	B	34,8	a	A

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5%, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

TABELA 3.3 – NÚMERO DE RAÍZES EM DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO AOS 90 DIAS.

ÉPOCA	TIPO DE ESTACA								
	10 cm			2 segmento (5cm)			1 segmento (5cm)		
Verão	0,11	b	A	0,00	a	A	0,00	d	A
Outono	0,86	a	A	0,08	a	C	0,50	b	B
Inverno	0,16	b	A	0,24	a	A	0,31	c	A
Primavera	0,10	b	B	0,10	a	B	0,82	a	A

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5%, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

A porcentagem de enraizamento foi baixa aos 90 dias. O enraizamento adventício é um processo organogênico pós-embrionário em que novos meristemas da raiz são induzidos a partir de uma sequência regulamentada da proliferação e diferenciação celular, na posição onde as raízes normalmente não se originariam (ROLLI et al., 2012; BOTIN; CARVALHO, 2015). A capacidade de

enraizamento depende de fatores endógenos e exógenos, como influências fisiológicas, idade e fase ontogenética da planta mãe, luz, temperatura e composição do meio de nutrição (NEMETH, 1986; BOTIN; CARVALHO, 2015).

Com relação ao comprimento da maior raiz, houve interação entre época e tipo de estaca. Somente as estacas de *P. lambertii* do primeiro segmento apresentaram diferença estatística (TABELA 3.4). Não houve diferença entre as doses utilizadas. De acordo com Alvarenga e Carvalho (1983), Dias (1999) e Botin e Carvalho (2015), as concentrações de reguladores empregadas devem ser ideais para cada espécie, pois qualquer acréscimo além do necessário torna-se inibitório. Esse fato possivelmente está relacionado ao efeito fitotóxico que a auxina pode ter em concentrações mais elevadas (ROCHA et al., 2004; NAVROSKI et al., 2014).

TABELA 3.4 – COMPRIMENTO (CM) DA MAIOR RAIZ DE DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* APÓS 90 DIAS NAS ESTAÇÕES DO ANO.

ÉPOCA	TIPO DE ESTACA								
	10 cm			2 segmento			1 segmento		
Verão	0,14	a	A	0,00	b	A	0,00	b	A
Outono	0,28	a	AB	0,11	b	B	0,44	a	A
Inverno	0,10	a	B	0,39	a	A	0,40	a	A
Primavera	0,10	a	B	0,13	b	B	0,43	a	A

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5%, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Houve uma alta formação de calos na base das estacas, os quais podem, durante algum tempo, realizar a função das raízes, ou seja, absorção de água e sais minerais (HARTMANN et al., 2011; NAVROSKI et al., 2014). Em todos os tratamentos e épocas foi observada o desenvolvimento de calos, independentemente da presença ou concentração de AIB (TABELA 3.5), esta formação é associada a espécies de difícil enraizamento (HARTMANN, 2011; XAVIER et al., 2013).

Nas estacas do segundo segmento que foram coletadas na primavera foi observada a maior formação de calos (TABELA 3.5). Novamente não foi observada a diferença significativa entre as doses utilizadas, somente houve a interação entre época e tipo de estaca. Hartmann et al. (2011), relatam que em algumas espécies a formação de calo é um precursor da formação de raízes adventícias. Além disso, conforme os mesmos autores, a formação de calos pode ser benéfica em plantas

que enraízam lentamente, como o *Podocarpus*, pois proporciona uma capa protetora que retarda o aparecimento da podridão.

TABELA 3.5 – PORCENTAGEM DE CALOGÊNESE EM DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO.

ÉPOCA	TIPO DE ESTACA								
	10 cm			2 segmento			1 segmento		
Verão	26,8	c	A	12	c	B	14	b	B
Outono	78,4	a	A	78,8	b	A	75,6	a	A
Inverno	67,2	b	A	76,4	b	A	65,2	a	A
Primavera	24	c	C	90,8	a	A	70,8	a	B

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5%, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Observa-se que o maior número de brotações de estaca aos 90 dias foi obtido no inverno com estacas de 10 cm de comprimento e no outono com estacas do primeiro segmento (TABELA 3.6).

TABELA 3.6 – NÚMERO DE ESTACAS COM BROTAÇÕES EM DIFERENTES TIPOS DE ESTACAS DE *Podocarpus lambertii* NAS ESTAÇÕES DO ANO.

ÉPOCA	TIPO DE ESTACA								
	10 cm			2 segmento			1 segmento		
Verão	0,04	b	A	0,00	b	A	0,00	c	A
Outono	0,05	b	B	0,00	b	B	0,28	a	A
Inverno	0,56	a	A	0,10	a	B	0,10	b	B
Primavera	0,00	b	B	0,12	a	A	0,04	bc	AB

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5%, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Novamente ocorreu a interação entre época e tipo de estaca, e não houve diferença significativa para as doses de reguladores utilizadas. Esse resultado sugere que as condições ambientais influenciam na brotação das estacas, Fachinello et al. (1995) afirmam que temperaturas mais elevadas podem proporcionar a brotação das gemas sem que haja formação de raízes, provocando perda de umidade da estaca sem absorção de água e tornando a brotação indesejável para o sucesso da estaquia. Porém, Rosa et al. (2017) relatam que a presença de folhas e brotações é importante para o transporte polar basípeto de auxina, devido a produção de auxina nas folhas jovens e nas gemas das brotações, esse transporte direciona o hormônio para a base da estaca, promovendo a formação das raízes.

A aplicação do regulador de crescimento de plantas para a indução do enraizamento de estacas de caule é muito relatada (HUSEN; PAL 2006, JANNAT et al., 2017). Embora existam vários reguladores para indução do enraizamento, o ácido indolbutírico (AIB) tem uma função muito importante no enraizamento de várias espécies (VERNIER; CARDOSO, 2013). Muitas espécies de plantas tropicais foram propagadas vegetativamente com sucesso por estacas de caule com a aplicação do regulador indutor de raiz AIB (JANNAT et al., 2017). No entanto, Jannat e Hossain (2016), relataram que nas diferentes concentrações de AIB ocorreu diferença no enraizamento para diferentes espécies. Jannat e colaboradores (2017) trabalhando com Tali (*Palaquium polyanthum* Engl.) verificaram a maior porcentagem de enraizamento (67%) em estacas tratadas com AIB a 0,4% que é semelhante aos trabalhos de Jannat et al. (2016) que relataram que *Schleichera oleosa*, mostrou melhores sucessos de enraizamento com 0,4% de tratamentos de AIB.

Na comparação entre os tipos de estacas de *Podocarpus lambertii*, observou-se que estacas semi lenhosas de 10 cm de comprimento no outono e as do primeiro segmento na primavera possuem maior porcentagem de enraizamento aos 90 dias, maior número de raízes, e independente do tipo de estaca o outono foi a melhor época para a sua sobrevivência das estacas. Isto provavelmente se deve à maior disponibilidade de nutrientes em estacas mais lignificadas, fazendo com que as estacas se mantenham vivas. De acordo com Dutra e Kersten (1996), a influência da época de estaquia no enraizamento de estacas ocorre por causa das variações no conteúdo dos co-fatores na formação e na acumulação de inibidores do enraizamento. Também o potencial de enraizamento pode ter sido influenciado pelas condições climáticas, sendo a temperatura um dos elementos mais importantes do clima (MARTINS et al., 2015). O enraizamento de estacas envolve divisões mitóticas com gasto de energia que tem origem em inúmeras reações químicas cuja velocidade e eficiência dependem da temperatura (MARTINS et al., 2015). Segundo Zuffellato-Ribas e Rodrigues (2001), quando as estacas são coletadas no verão, os ramos estão em pleno crescimento e apresentam maiores doses de auxinas em relação àquelas que são retiradas no outono e inverno.

De modo geral, a interação entre esses fatores permite melhor explicar as causas do enraizamento, ou seja, quanto mais difícil o enraizamento de uma

espécie, maior será a importância dos fatores envolvidos (FACHINELLO et al., 2005; NIENOW et al., 2010).

3.4 CONCLUSÃO

A utilização de AIB não tem influência no enraizamento de *Podocarpus lambertii*. Entretanto, a primavera é a estação mais indicada para propagação vegetativa da espécie, preferencialmente utilizando estacas obtidas do primeiro segmento nodal.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, L.R.; CARVALHO, V.D. de. Uso de substancias promotoras de enraizamento de estacas de frutíferas. **Informativo Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

BOTIN, A.A.; CARVALHO, A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista De Ciências Agroambientais**, v. 13, n. 1, p. 83-96, 2015.

BRAGA, M.F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUSA, A.A.T.C.; FALEIRO, F.G.; REZENDE, L.N.; JUNQUEIRA, K.P. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de passiflora. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 284-288, 2006.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M. A.; PIRES, P. P. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 153-158, 2008.

CARVALHO, P.E.R. Pinheiro bravo (*Podocarpus lambertii*). Circular técnica - 95 Embrapa Florestas, 2004.

COSTA, E.C.; BOSCARDIN, JI. Ocorrência de Lagartas Desaciculadoras em *Podocarpus lambertii* Klotzsh ex Eichler no Sul do Brasil. **Entomobrasilis**, v.7, n.3, p.238-240, 2014. Entomo Brasilis. <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v7i3.438>.

DIAS, P.C.; ATAÍDE, G.M.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; PAIVA, H.N. Propagação vegetativa de *Schizolobium amazonicum* por estaquia. **Cerne**, v.21, n.3, p.379-386, set. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/01047760201521031467>.

DIAS, P.C.; DE OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32 n.72, p.453, 2012.

DIAS, R.M.S.L.; FRANCO, E.T.H.; DIAS, C.A. Enraizamento de estacas de diferentes diâmetros em *Platanus acerifolia* (Aiton) Willdenow. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.2, p.127-136, 1999.

DUTRA, L.F.; KERSTEN, E. Efeito do substrato e da época de coletas de ramos no enraizamento de estacas de ameixeira (*Prunus salicina* L.). **Ciência Rural**, v.26, n. 3, p. 361-366, 1996.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. (Ed.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.69-109.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: Universitária, 1995. 178p.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 22 p.

FERRIANI, A.P.; MAYER, J.L.S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; BONA, C.; KOEHLER, H.S.; DESCHAMPS, C.; CARPANEZZI, A.A.; OLIVEIRA, M.C. Estaquia e anatomia de Vassourão-branco. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.2, p.159- 166, 2008.

GERDING, V.; HERMOSILLA, M.E.; GREZ, R. Sustratos de corteza compostada para la propagación vegetativa de estacas de tallo de *Podocarpus nubigena* Lindl, y *Eucryphia cordifolia* Cav. **Bosque**, n. 17, v.2, p. 57-64, 1996.

HARTMANN, H. T. **Plant propagation: Principles and practices**. 8 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HUSEN, A.; PAL, M. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **New Forest**, v.31, p. 57-73, 2006.

IUCN Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T34086A2844519.en> . Dados de **05 de dezembro de 2016**.

JANNAT, M.; HOSSAIN, M.K.; ALAM, M. S.; HOSSAIN, M. A.; KAMRUZZAMAN, M. Vegetative propagation of Tali (*Palaquium polyanthum* Engl.) for commercial harvest and landscape conservation. **Rhizosphere**, v.3, p. 9-12, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.11.003>.

JANNAT, M.; HOSSAIN, M.K.; KAMRUZZAMAN, M. Vegetative propagation potential of Kusum (*Schleichera oleosa* Lour) by stem cutting from young stock plants. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, v.2, n.10, p. 106-110, 2016.

JANNAT, M.; HOSSAIN, M.K. Vegetative Propagation potential of Moss (*Brownlowia elata* Roxb) by Stem Cuttings from Young Stock Plants. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.7, n.8, p.1342-1348, 2016.

KHAN, A. G. Effects of Temperature Gibberellic Acid and Indolylacetic Acid on Root and Shoot Growth of Cutting From *Podocarpus Lawrencei* Hook F. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.21, n.3, p. 573-578, 1968.

MARTINS, W. A.; MANTELLI, M.; SANTOS, S. C.; NETTO, A.P.C.; PINTO, F. Estaquia e concentração de reguladores vegetais no enraizamento de *Campomanesia adamantium*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n.1, p.58-64, 2015.

NAVROSKI, M.C.; PEREIRA, M.O.; HESS, A.F.; SILVESTRE, R.; ÂNGELO, A.C.; FAZZINI, A.J.; ALVARENGA, A.A.; Resgate e propagação vegetativa de *Sequoia sempervirens*. **Floresta**, v.45, n.2, p.383-392, 2015. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v45i2.35407>.

NEMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. I. Trees. Springer, Berlin, p 49–64, 1986.

NIENOW, A.A.; CHURA, G.; PETRY, C.; COSTA, C. Enraizamento de estacas de Quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Current Agricultural Science and Technology**, v.16, n.1-4, 2010.

PONTES FILHO, F.S.T.; ALMEIDA, E.I.B., BARROSO, M.M.A.; CAJAZEIRA, J.P.; CORREA, C.M. Comprimento de estacas e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) na propagação vegetativa de pitaiá. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n. 4, p. 788-793, out-dez, 2014.

RAGAGNIN, L.I.M.; COSTA, E.C.; HOPPE, J.M. Maturidade fisiológica de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotzsch. **Ciência Florestal**, v.4, n.1, p. 23-41, 1999.

ROCHA, S.C.; QUEIROZ, J.A.L.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Propagação vegetativa de espiroleira pela técnica da estaquia. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.5, n.1-2, p.73-77, 2004.

ROLLI, E.; INCERTI, M.; BRUNONI, F.; VICINI, P.; RICCI, A. Structure activity relationships of N-phenyl-N'-benzothiazol-6-ylurea synthetic derivatives: Cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement. **Phytochemistry**, v.74, p.159-165, 2012.

ROSA, G. G.; ZANANDREA, I. MAYER, N.A. BIANCHI, V.J. Propagação de porta-enxerto de *Prunus* spp. por estaquia: efeito do genótipo, do estágio de desenvolvimento do ramo e tipo de estaca. **Revista Ceres**, v.64, n.1, p.90-97, fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764010013>.

SIMÃO, E.; NAKAMURA, A. T.; TAKAKI, M. Época de colheita e capacidade germinativa de sementes de *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, São Paulo, v.7, n.1, p. 67-73, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C. S. F.; LESSA, A. O.; SALERNO, A. R. Enraizamento de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss (catigua) em diferentes estações do ano. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 435-442, 2008.

VERNIER, R.M.; CARDOSO, S.B. Influência do ácido indol-butírico no enraizamento de estacas em espécies frutíferas e ornamentais. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v.3, n. 2, p. 11-16, 2013.

WENDLING, I.; FERRARI, M.P.; DUTRA, L.F. Produção de mudas de corticeira-do-banhado por miniestaquia a partir de propágulos juvenis. Comunicado técnico, Colombo, n.130, p. 1-5, out. 2005.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed., Viçosa/MG: Editora UFV, 2013. 279 p.

ZUFFELLATO-RIBAS; C.K.; RODRIGUES, D. J. **Estaquia: Uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos**. Curitiba, EUFPR, 2001.

4 MORFOGÊNESE DOS RAMOS SECUNDÁRIOS DA *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE APÓS PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

RESUMO

Uma das dificuldades no desenvolvimento de um método eficaz de propagação vegetativa da *Araucaria angustifolia* é a obtenção de grande quantidade de brotações com hábito ortotrópico, devido ao dimorfismo dos seus ramos. Assim o objetivo deste trabalho foi descrever o comportamento morfológico e o tropismo dos ramos secundários de *A. angustifolia* propagados por enxertia e estaquia. Foram conduzidos três experimentos entre 2006 e 2017, sendo dois com enxertia e um com estaquia. Os propágulos de grimpas foram obtidos de uma planta matriz adulta e submetidos à enxertia e estaquia em 2006. No terceiro experimento foram utilizados propágulos de grimpas enraizadas (do segundo experimento) mantidas tutoradas em viveiro para enxertia em porta enxertos de aproximadamente dois anos. Os resultados apontaram diferenças marcantes no desenvolvimento e na morfogênese das grimpas de *A. angustifolia* enxertadas e enraizadas. Enxertos de ramos secundários tem crescimento plagiotrópico, sem ramificação e tempo de vida limitado, com senescência e morte após 3-5 anos. Estacas de ramos secundários permanecem vivas após 11 anos, com crescimento plagiotrópico e rasteiro necessitando de tutoramento. Seus ramos terciários são organizados em verticilos bem definidos. Estudos devem ser realizados para verificar a existência de um possível mecanismo fisiológico durante o processo de enraizamento responsável pela longevidade dos ramos secundários e simetria na ramificação. Enxertos com propágulos de grimpas enraizadas mantêm as características do material de origem, porém apresentam maior engrossamento e estabilidade na planta, não necessitando de tutoramento, como verificado na enxertia de ramos secundários obtidas de plantas adultas.

Palavra-chave: Enxertia. Estaquia. Plagiotropismo.

MORPHOGENESIS OF THE SECONDARY BRANCHES OF *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE AFTER VEGETATIVE PROPAGATION

ABSTRACT

One of the difficulties in the development of an effective method for vegetative propagation of *Araucaria angustifolia* is obtaining a large quantity of shoots with orthotropic habit, due to the dimorphism of its branches. Thus, the objective of this work was to describe the morphological behavior and tropism of the secondary branches of *A. angustifolia* propagated by grafting and cutting. Three experiments were conducted between 2006 and 2017, two with grafting and one with cuttings. Aciculated branch propagules were obtained from an adult matrix plant and submitted to grafting and cutting in 2006. In the third experiment, rooted aciculated branch propagules (from the second experiment) were maintained tutored in the nursery for grafting on approximately two year old rootstocks. The results showed differences in the development and morphogenesis of grafted and rooted *A. angustifolia* aciculated branch propagules. Grafts of secondary branches have plagiotropic growth, with no ramification and limited lifetime, with senescence and death after 3-5 years. Cuttings of secondary branches remain alive after 11 years, with plagiotropic and creeping growth, requiring tutoring. Its tertiary branches are arranged in well-defined whorls. Studies should be performed to verify the existence of a possible physiological mechanism during the rooting process responsible for the longevity of the secondary branches and symmetry in the ramification. Grafts with rooted aciculated branch propagules maintain the characteristics of the original material, but present a greater thickening and stability in the plant, not needing to be tutored, as verified in the grafting of secondary branches obtained from adult plants.

Key words: Grafting. Cuttings. Plagiotropism.

4.1 INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia conhecida popularmente como pinheiro do Paraná, ou araucária é uma conífera nativa do Brasil com importância econômica e ecológica (MARAN et al., 2016; GASPARIN et al., 2017; ZANETTE et al., 2017). Seu interesse econômico está relacionado, principalmente, ao seu tronco que dá

suporte a uma copa com arquitetura muito característica. Segundo Carvalho (1994) e Zanette et al. (2017), apresenta tronco reto e cilíndrico, com verticilos bem definidos (8 a 15), dependendo da idade da planta, cada um contando com 6 a 8 ramos dispostos radialmente, onde se originam as pinhas, cujo produto (pinhão) também é de grande interesse comercial. Ainda segundo os autores, os ramos primários e secundários são de hábito plagiotrópico, ocasionando o crescimento lateral. Os ramos secundários são conhecidos por grimpas ou sapés e contêm as folhas denominadas de acículas (CARVALHO, 1994; ZANETTE et al., 2017).

É uma espécie componente da Floresta Ombrófila Mista (ZANETTE et al., 2017), inclusa na lista da IUCN de espécies ameaçadas de extinção como criticamente ameaçada (THOMAS, 2013), devido a intensa exploração de sua madeira e da abertura de novas frentes agrícolas (ZANETTE et al., 2017). Sua propagação é predominantemente por sementes (CARVALHO, 1994; OLIVEIRA et al., 2014), que apresentam características recalcitrantes e, portanto, tempo limitado de conservação (ROBERTS, 1973; CARVALHO, 1994), restringindo a produção de mudas a poucos meses do ano.

Uma alternativa para a conservação da espécie segundo Pijut et al. (2011) e Wendling e Brondani (2015), é o desenvolvimento de métodos de propagação vegetativa. Nesse sentido, a enxertia e a estaquia têm sido estudadas como métodos potenciais para a propagação da araucária (ZANETTE et al., 2011; CONSTANTINO; ZANETTE, 2015; WENDLING; BRONDANI, 2015), embora ainda apresentem problemas, relacionados principalmente com o tropismo dos ramos. A espécie apresenta dimorfismo de ramos, característica marcante de todas as plantas da família Araucariaceae e também verificada no cafeeiro. De acordo com Carvalho et al. (1950), este fenômeno se caracteriza por uma diferenciação somática permanente em que propaga-se diferentes ramos por propagação vegetativa. Portanto, como a copa da araucária é constituída predominantemente por ramos plagiotrópicos, o principal problema é a dificuldade de obtenção de brotações com hábito de crescimento ortotrópico (ZANETTE et al., 2011; WENDLING et al., 2017). Zobel e Talbert (1984) relataram que quando enxertados propágulos de origem plagiotrópica, as brotações assumem crescimento desviado da vertical e crescem de forma similar a um ramo lateral. Este fenômeno já tinha sido detectado por Gurgel e Gurgel Filho (1967) trabalhando com a enxertia em *A. angustifolia*. Os autores notaram diferenças no crescimento de enxertos realizados

com ramos ortotrópicos e plagiotrópicos. De acordo com Wendling et al. (2009), Zanette et al. (2011) e Constantino e Zanette (2015), apenas propágulos de origem ortotrópica desenvolvem copa normal, portanto são os indicados para o resgate e multiplicação da araucária.

Devido à escassez de ramos ortotrópicos, Constantino e Zanette (2015) enxertaram propágulos de origem ortotrópica em ramos primários plagiotrópicos buscando a multiplicação de borbulhas. Como resultando obtiveram brotações com crescimento ortotrópico, cujas ramificações primárias apresentavam-se organizadas em verticilos bem definidos. O alto percentual de sobrevivência indicou que houve boa união dos tecidos cambiais, apesar da diferença morfológica entre tronco (enxerto) e ramos (porta-enxerto). Nesse sentido, o crescimento ortotrópico não é influenciado pelo porta-enxerto, mas pela origem do propágulo, indicando haver uma memória celular fixada que define o crescimento do enxerto. Assim, se obtido do tronco terá comportamento morfogênico semelhante à de uma planta produzida a partir de semente; se obtido de ramo, se comportará como tal.

Os diferentes comportamentos de crescimento e desenvolvimento dos caules (tronco, ramos) da *A. angustifolia*, onde um não regenera outro, configura um fenômeno de interesse teórico e prático, principalmente quando o objetivo é a propagação vegetativa da espécie. Resta, porém, compreender o comportamento morfogênico das grimpas, uma vez que se comportam como folhas e tem tempo de vida limitado. Devido a ausência de informações sobre o assunto, o objetivo deste trabalho é descrever o comportamento de crescimento de ramos secundários “grimpas” da *A. angustifolia*, submetido à enxertia e estaquia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado entre 2006 e 2017 no viveiro do GEVA do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR (25°25' de latitude Sul e 49°16' de longitude Oeste), e 934 m de altitude em Curitiba, PR.

Foram realizados três experimentos, cada um contando com 20 plantas, conforme descrição a seguir:

4.2.1 Experimento I - Enxertia de grimpas por garfagem em porta-enxerto jovem

Foi utilizada a técnica de enxertia por garfagem, conforme Zanette et al. (2011). Os procedimentos foram realizados no mês de março de 2006 em casa de vegetação utilizando porta-enxertos jovens de aproximadamente oito meses de idade e 40 cm de altura, produzidos a partir de sementes.

Os garfos foram coletados de ramos secundários (grimpa) de uma planta fêmea adulta de araucária da variedade “São José”, localizada dentro do próprio viveiro. A enxertia ocorreu no mesmo dia, logo após a coleta do material. Após cinco meses os enxertos foram transferidos para o solo no viveiro do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, onde permaneceram por cinco anos, durante o período de avaliação do experimento. Parte dos enxertos foram tutorados com auxílio de estacas de bambu e conduzidos na vertical (FIGURA 4.1-G e H). As brotações foram avaliadas quanto a sobrevivência, morfologia e direção do crescimento.

4.2.2 Experimento II - Enraizamento de grimpas da *A. angustifolia*

A estaquia foi realizada em março de 2006. As estacas foram preparadas com 5 cm de comprimento e, na metade basal, as acículas foram retiradas e o corte foi realizado em bisel. Após o processo de desinfestação, a base das estacas foram imersas por um minuto em solução de ácido indol-3-butírico (3000 mg.L^{-1}) e plantadas em bandejas contendo vermiculita como substrato, permanecendo em casa de vegetação com nebulização intermitente por 13 meses.

Após o enraizamento, as plantas foram transferidas para sacos plásticos com substrato e mantidas em casa de vegetação por 11 meses e depois transferidas para viveiro em ambiente aberto, em solo a pleno sol. As plantas foram tutoradas com auxílio de estacas de bambu e conduzidas na vertical (FIGURA 4.2-D e E). As plantas foram avaliadas quanto à morfologia e as brotações da base da estaca em relação à direção do crescimento e disposição dos ramos.

4.2.3 Experimento III - Enxertia propágulos retirados das grimpas enraizadas

Foram realizados dois tipos de enxertia: por placagem e por garfagem de topo (FIGURA 4.1- A e C), conforme Zanette et al. (2011), em maio de 2011. Os propágulos utilizados como enxertos foram retirados do eixo principal de grimpas propagadas por estaquia (FIGURA 4.2- F), com 5 anos de idade, cultivadas tutoradas no viveiro do GEVA.

Os porta-enxertos foram produzidos a partir de sementes e possuíam cerca de dois anos de idade e 80 cm de altura quando enxertados.

As plantas enxertadas permaneceram no viveiro até que o enxerto atingisse em torno de 15 cm. Oito plantas foram plantadas no solo no viveiro do GEVA e o restante na Estação Experimental do Canguiri, para avaliação futura.

Os enxertos foram avaliados quanto à morfologia, direção de crescimento e disposição dos ramos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Experimento I – Enxertia de grimpas

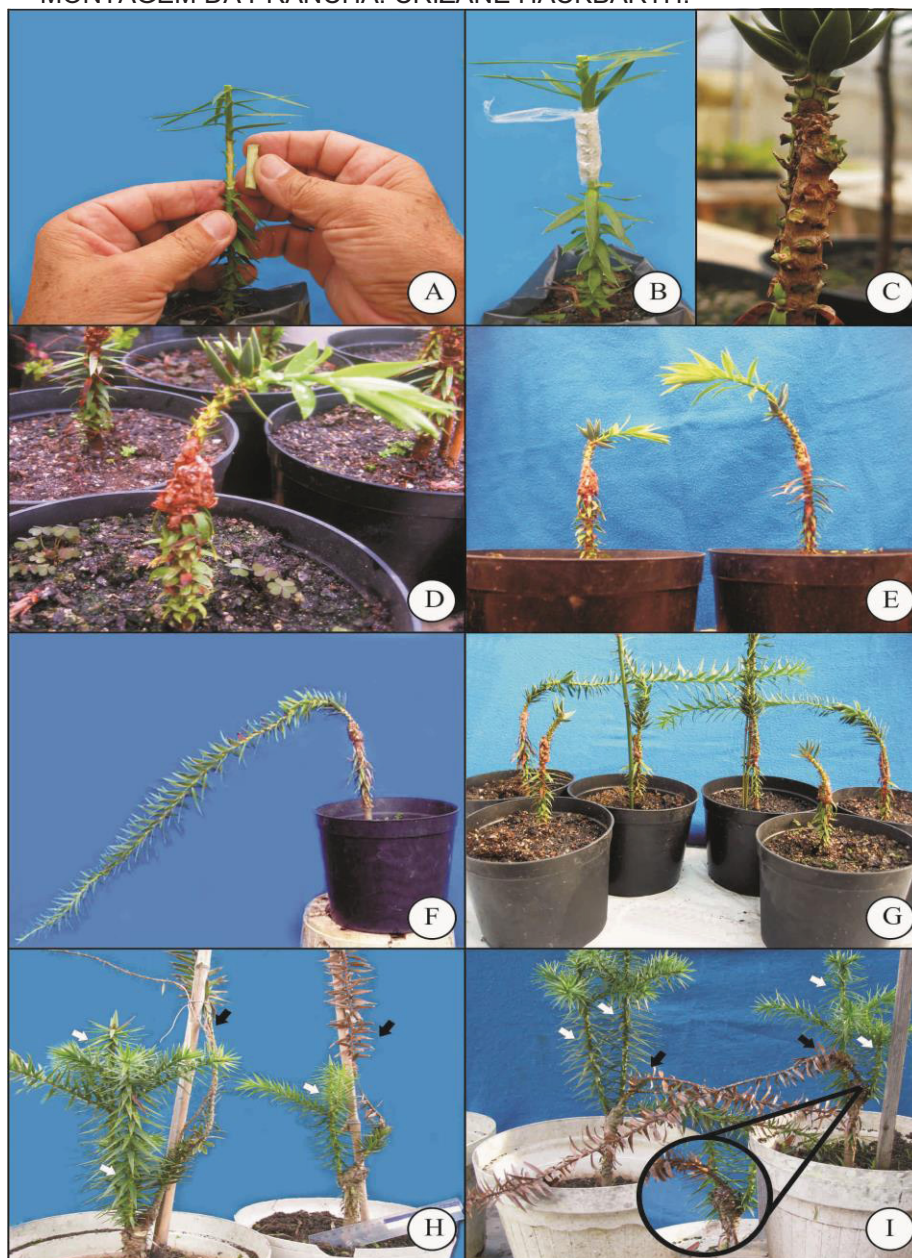
Na FIGURA 4.1 são apresentadas as duas técnicas de enxertia: placagem (A) e garfagem (B). As demais figuras mostram os resultados da enxertia e o comportamento de crescimento dos enxertos (FIGURA 4.1 - C, D, E, F, G, H, I).

Os ramos secundários enxertados mantiveram as mesmas características do local de onde foram obtidos. No entanto, se apresentaram alongados e não emitiram ramificação (terciária), como geralmente verificado na araucária (FIGURA 4.1-F).

Na região do enxerto foi observada lignificação, e mesmo assim, foi necessário o tutoramento para o enxerto permanecer na vertical (FIGURA 4.1-F e H).

O tempo de vida dos enxertos foi de 4 a 5 anos. Este comportamento pode ter sido em decorrência de fatores endógenos do ramo, uma vez que normalmente os ramos secundários da araucária tem um período de vida limitado entre 5 a 7 anos (IRITANI et al., 1992; ZANETTE et al., 2017).

FIGURA 4.1 - ENXERTIA DE RAMO SECUNDÁRIO DE *A. angustifolia* POR PLACAGEM LENHOSA (A,B). DETALHE DA CICATRIZAÇÃO DO ENXERTO (C). CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO DOS ENXERTOS (D,E) COM DETALHE DO CALO FORMADO (D). CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO DO RAMO ENXERTADO, COM AUSÊNCIA DE RAMIFICAÇÕES (F). ENXERTOS COM TUTORAMENTO E SEM TUTORAMENTO (G). SENESCÊNCIA E MORTE DOS ENXERTOS APÓS CERCA DE 3-5 ANOS, TANTO ENXERTOS TUTORADOS (H) QUANTO NÃO TUTORADOS (I), INDICADOS POR FLECHAS PRETAS. FLECHAS BRANCAS INDICAM AS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO. FOTOS: FLAVIO ZANETTE. MONTAGEM DA PRANCHA: CRIZANE HACKBARTH.



A Araucária pertence à família Araucariaceae e nesta família os ramos secundários, quando presentes, são caracterizados por um crescimento determinado em comprimento e diâmetro e são considerados os órgãos predominantes da fotossíntese (VEILLON, 1981). Poucas espécies da família

Araucariaceae apresentam abscisão individual de folhas, sendo mais comum a abscisão dos ramos, o que torna isto uma característica comum da família (BURROWS et al., 2007). Algumas informações são encontradas na literatura sobre o tempo de vida limitada dos ramos secundários da araucária (IRITANI et al., 1992; WENDLING, 2011; ZANETTE et al., 2017).

Em *Wollemia nobillis*, espécie recém-descoberta da família Araucariaceae, a abscisão ocorre em ramos primários, e está associada à constrição do xilema na base do ramo, de forma tão pronunciada que restringe o fornecimento de água para o ramo e folhas (BURROWS et al., 2007). Este mesmo fenômeno poderia ser a causa da abscisão das grimpas na *A. angustifolia*.

Outra hipótese para morte do enxerto é a incompatibilidade entre o enxerto e porta-enxerto (KAGEYAMA; FERREIRA, 1975). Em algumas plantas foi observada a formação de calo na região do enxerto (FIGURA 4.1-D). Condição semelhante na formação de calo também foi relatada por Iritani et al. (1992) e Wendling (2011).

Apesar do tempo de vida limitado, as grimpas se formam na extremidade dos ramos primários, são flexíveis e têm crescimento anatrópico (sem direção preferencial). Seu plastocromo (ritmo de formação) é contínuo, enquanto viver a planta (ZANETTE et al., 2017).

Os ramos de *A. angustifolia* exibem dimorfismo (ZANETTE et al., 2011, 2017; HACKBARTH et al., 2017), sendo que os ramos primários e os secundários apresentam crescimento desviado da vertical (plagiotrópico) (WENDLING et al., 2017).

Ramos plagiotrópicos utilizados na enxertia e estaquia são incapazes de formar um indivíduo com copa completa, porque mantêm sua forma de crescimento lateral e são incapazes de formar um dossel completo (KAGEYAMA; FERREIRA, 1975, IRITANI et al., 1992; ZANETTE et al., 2011; WENDLING et al., 2011). Essa característica permanece mesmo que sejam enxertados em uma haste ortotrópica (ZANETTE et al., 2011).

O plagiotropismo caracteriza-se por uma diferenciação somática, que é permanente em *A. angustifolia*, cujos mecanismos de regulação são complexos e necessitam de mais estudos para esclarecimento (KAGEYAMA; FERREIRA 1975). Hackbarth et al. (2017) encontraram diferenças nos aminoácidos de tronco, ramos e grimpas de *A. angustifolia*.

Embora o plagiotropismo dos ramos seja um limitador para a enxertia em araucária, vários trabalhos têm demonstrado a viabilidade da técnica (ANSELMINI e ZANETTE 2008; WENDLING et al., 2009; ZANETTE et al., 2011; CONSTANTINO e ZANETTE 2015; WENDLING et al., 2017). Há, no entanto, a necessidade do aperfeiçoamento de técnicas que induzam brotações de crescimento vertical (ortotrópico) ao longo do tronco, ou que seja montado jardins clonais para fornecimento de borbulhas, suficientes para enxertia em larga escala (WENDLING et al., 2017).

4.3.2 Experimento II – Estaquia de grimpas

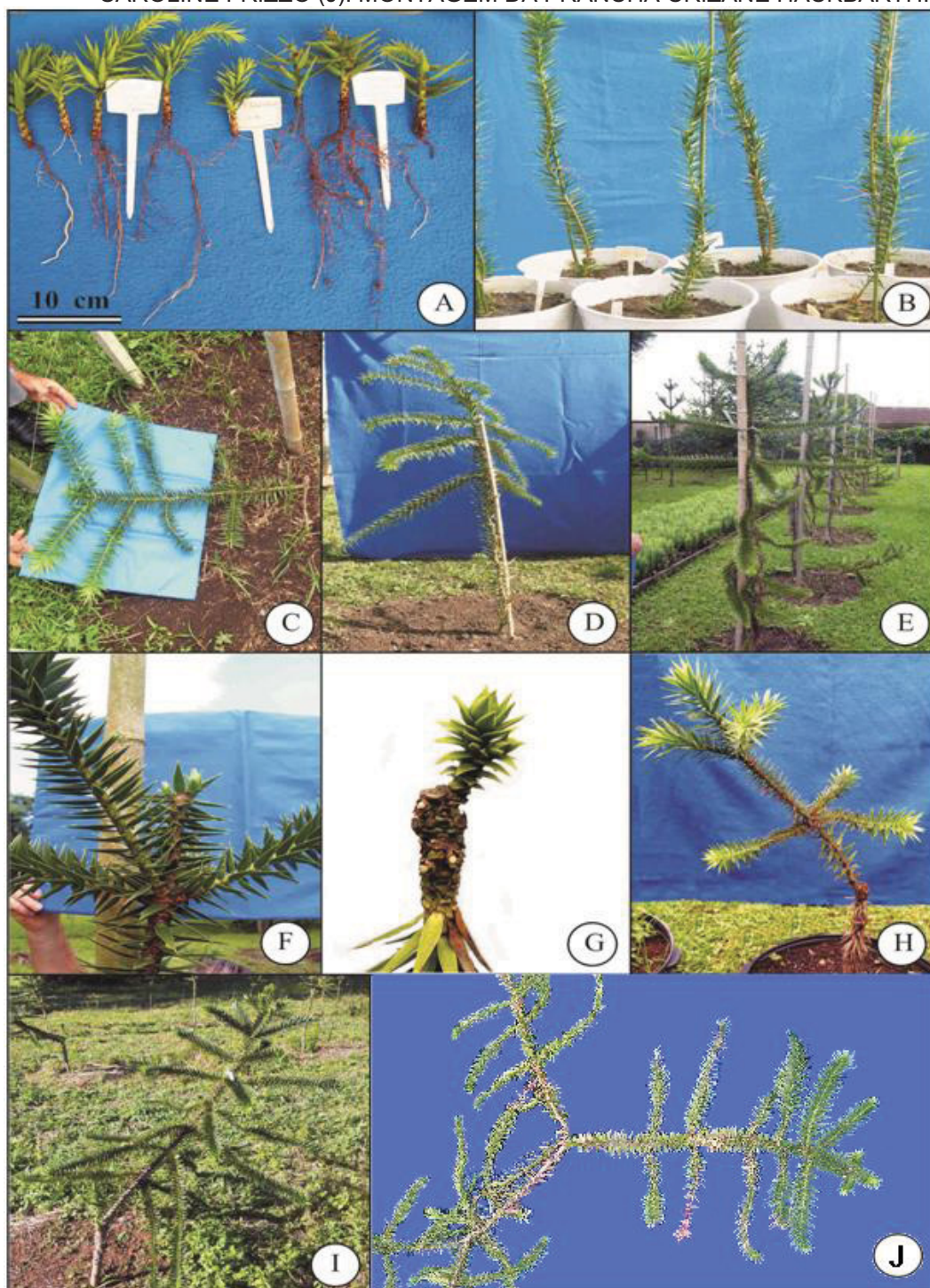
Na FIGURA 4.2 são apresentados os resultados da estaquia com propágulos de ramos secundários.

Foi alcançada uma taxa de enraizamento em torno de 40% para o enraizamento de estacas de grimpas de araucária, com bom sistema radicial (FIGURA 4.2-A). Segundo Wendling et al. (2017b), a estaquia em araucária tem comportamento semelhante à de outras coníferas, quase sempre definidas como espécies de difícil enraizamento, principalmente quando os propágulos têm origem em plantas adultas.

Devido ao dimorfismo que a espécie apresenta, os propágulos utilizados devem ser de origem ortotrópica (WENDLING et al., 2017b). Porém, segundo os autores, os resultados apresentados até o momento para a estaquia de araucária não condizem com o sucesso esperado pelo uso desta técnica para fins comerciais, não ultrapassando os 25% (IRITANI; SOARES, 1983), 30% (WENDLING; BRONDANI, 2015) e 53,7% (WENDLING et al., 2016b).

Os resultados têm inviabilizado o uso do processo em escala comercial por uma série de limitações, principalmente em relação aos baixos índices de enraizamento de material adulto, hábito de crescimento das brotações, entre outros (WENDLING et al., 2017b). Contudo a utilização da técnica de miniestaquia, promoveu avanços na propagação vegetativa da espécie, com a obtenção de maiores índices de enraizamento e consequente diminuição ou mesmo eliminação do uso de reguladores vegetais para indução radicial, além do aumento considerável na taxa de multiplicação de genótipos selecionados (WENDLING et al., 2017b).

FIGURA 4.2- ESTACAS ENRAIZADAS DE RAMOS SECUNDÁRIOS DE *A. angustifolia* (A). ESTACAS COM TUTORAMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO (B). ESTACA COM CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO RENTE AO CHÃO, PLANTADA EM LOCAL DEFINITIVO, COM RAMIFICAÇÕES BILATERAIS ORGANIZADAS EM VERTICILLOS (C, J). ESTACA COM TUTORAMENTO, COM DETALHE DAS RAMIFICAÇÕES ORGANIZADAS EM VERTICILLOS (D,E). RAMIFICAÇÃO DO QUARTO VERTÍCULO DA ESTACA EM SIMETRIA RADIAL (F). ENXERTO DE PROPÁGULO RETIRADO DA ESTACA DOS RAMOS SECUNDÁRIOS DE *A. ANGUSTIFOLIA* (G). CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO DO RAMO ENXERTADO, SEM TUTORAMENTO, E COM RAMIFICAÇÕES ORGANIZADAS NOS VERTICILLOS E SIMETRIA RADIAL (H,I). FOTOS: FLAVIO ZANETTE (A,B,C,D,E,F,G,H,I) E CAROLINE FRIZZO (J). MONTAGEM DA PRANCHA CRIZANE HACKBARTH.



Da mesma forma que na enxertia de grimpas, estacas de grimpas enraizadas também apresentaram crescimento plagiotrópico, rente ao chão, característico deste tipo de ramo (FIGURA 4.2-C), sendo necessário tutorá-las para mantê-las na vertical (FIGURA 4.2- D e E). Porém, diferente da enxertia, as estacas se mantêm vivas atualmente, com mais de 11 anos, sem sinal de senescência, contrariando as informações encontradas na literatura sobre o tempo de vida limitada dos ramos secundários da araucária (IRITANI et al., 1992; WENDLING, 2011; ZANETTE et al., 2017).

O crescimento das estacas é vigoroso resultando em maior espessura na região apical e menor na região basal, onde é mais lignificada, contribuindo para a incapacidade da estaca se manter estável verticalmente.

Quando submetida a decepa do ápice, a estaca também apresenta brotações numerosas e vigorosas com tendência de crescimento vertical (FIGURA 4.2- F), mas que se torna horizontal com o tempo.

Diversas brotações foram observadas na base das estacas evidenciando uma basitonía, que é caracterizada pelo favorecimento da brotação das gemas basais (STRASBURGER et al., 1994). As brotações apresentaram-se vigorosas, algumas com crescimento inicial tendendo para vertical, tornando-se rasteiras com o tempo, mostrando que independente do vigor inicial, o tropismo característico prevalece (FIGURA 4.2-J).

Geralmente na araucária é observada a acrotomia, que é o predomínio das brotações do ápice, e está relacionada à dominância/controle apical. A *Araucaria angustifolia* pertence à família Araucariaceae e possui polo meristemático na axila de cada acícula, ou seja, células capazes de se diferenciarem quando livres da dominância apical (IRITANI et al., 1992; BURROWS, 2002; WENDLING et al., 2017). A estaca dos ramos secundários, apesar de estar livres do efeito do controle apical, observado naturalmente na *A. angustifolia*, não foi capaz de exercer este controle sobre novas brotações em sua base, além de manter o crescimento plagiotrópico.

A ramificação de grimpas enraizadas inicialmente é bilateral, geralmente até o terceiro verticilo (FIGURA 4.2-C). A partir do quarto verticilo o número de ramos aumenta e a ramificação passa a ter simetria radial, com entrenós bem definidos (FIGURA 4.2- E, F e J). Esse comportamento morfogênico é diferente do que foi

observado na enxertia de grimpas, que não apresentou nenhuma ramificação (FIGURA 4.1).

Como existe hipótese de fatores endógenos limitando a sobrevivência de ramos secundários enxertados, também existe a hipótese de um mecanismo responsável por alterações fisiológicas, principalmente hormonais, desencadeado durante o processo de enraizamento, com efeito na longevidade das grimpas e mudança morfológica definitiva.

4.3.3 Experimento III - Enxertia com propágulo de grimpas enraizadas

Conforme pode ser observado, a mudança morfológica com as ramificações organizadas em verticilos bem definidos persistiu com a enxertia de propágulos retirados das plantas produzidas através da estaquia (FIGURA 4.2- H e I).

Diferente do observado na enxertia de grimpas obtidas de plantas adultas, onde os enxertos tiveram tempo de vida limitado (FIGURA 4.1-H e I), na enxertia com propágulos obtidos das estacas enraizadas os enxertos permanecem vivos atualmente, com quase sete anos. Os ramos enxertados, apesar de manterem o crescimento plagiotrópico, apresentaram um maior engrossamento e foram capazes de se sustentarem sozinhos na planta, sem a necessidade de tutoramento, diferentemente do que foi observado na estaquia.

O comportamento morfológico diferenciado entre enxerto e porta-enxerto, onde o primeiro tem crescimento em diâmetro determinado e o segundo indeterminado, impede uma interação perfeita entre ambos, provocando no decorrer do tempo um processo de incompatibilidade. Além disso, a função da nova copa, na verdade é de um ramo secundário.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados apontam diferenças marcantes no desenvolvimento e na morfogênese das grimpas de *A. angustifolia* enxertadas e enraizadas.

- Enxertos de ramos secundários (grimpas) têm crescimento plagiotrópico, sem ramificação e tempo de vida limitado, com senescência e morte após 3-5 anos.

- Estacas de ramos secundários (grimpas) permanecem vivas após 11 anos, com crescimento plagiotrópico e rasteiro necessitando de tutoramento. Seus ramos terciários são organizados em verticilos bem definidos.
- Enxertos com propágulos de grimpas enraizadas mantém as características do local de origem. Porém apresentam maior engrossamento e estabilidade na planta, não necessitando de tutoramento.

REFERÊNCIAS

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.967-973, 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000400010

BURROWS, G. E.. Axillary Meristems and the Development of Epicormic Buds in Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*). **Annals Of Botany**, v. 92, n. 6, p.835-844, 8 out. 2003. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg207>

BURROWS, G. E.; MEAGHER, P. F.; HEADY, R. D. An Anatomical Assessment of Branch Abscission and Branch-base Hydraulic Architecture in the Endangered *Wollemia nobilis*. **Annals Of Botany**, v. 99, n. 4, p.609-623, 30 nov. 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm003>.

CARVALHO, A.; KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.. O dimorfismo dos ramos em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 10, n. 6, p.151-159, jun. 1950. <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87051950000600001>.

CARVALHO, P.E.R.; Pinheiro do Paraná. Circular técnica - 60 EMBRAPA Florestas. Colombo PR p.17. 2002.

CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F. Produção de borbulhas ortotrópicas para enxertia de *Araucaria angustifolia*. **Acta Biologica Paranaense**, Curitiba, v.44, n.4-5, p.49-55, 2015.

CUEVAS-PÉREZ, F. E.; GUIMARÃES, E. P.; BERRÍO, L. E.; GONZÁLEZ, D. I. Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean, 1971 to 1989. **Crop Science**, v.32, p.1054-1059, 1992.

GASPARIN, E.; FARIA, J.M.R.; JOSÉ, A.C.; HILHORST, H.W.M. Physiological and ultrastructural responses during drying of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia*. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 112-129, 2017. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2017.45.1.01>

GURGEL, J. T. A; GURGEL-FILHO, C. A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze, visando à formação de pomares de sementes. **Silvicultura em São Paulo**, v. 6, p. 153-155, 1967.

HACKBARTH, C.; SOFFIATTI, P.; ZANETTE, F.; FLOH, E.I.S.; MACEDO, A.F.; LAUREANO, H.A. Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Journal Of Forestry Research**, p.1-8, 28 dez. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-017-0581-6>.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. Boston: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. **Silvicultura**, v. 8, n. 28, p. 313-317, 1983.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axiliares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biologica Paranaense**, v. 21, n. 1- 4, p. 57-76, 1992.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **IPEF**, Piracicaba, v. 12, p. 95-102, 1975.

MARAN, J.C.; ROSOT, M.A.D.; RADOMSKI, M.I.; KELLERMANN, B. Análise de sobrevivência e germinação em plantios de *Araucaria angustifolia* derivado de mudas e sementes. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p.1349-1360, 28 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509825154>.

PIJUT, P.M.; WOESTE, K.E.; MICHLER, C.H. Promotion of Adventitious Root Formation of Difficult-to-Root Hardwood Tree Species. **Horticultural Reviews**, p.213-251, 28 fev. 2011.

RAGONEZI, C.; KLIMASZEWSKA, K.; CASTRO, M. R.; LIMA, M.; OLIVEIRA P.; ZAVATTIERI, M. A. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. **Trees**, v. 24, p. 975-992, 2010. DOI: 10.1007/s00468-010-0488-8.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499- 514, 1973.

STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHIMPER, A.F.W. Tratado de Botânica, 6^aed, Barcelona: Marin, 1994.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T32975A2829141. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T32975A2829141.en>. Downloaded on 20 December 2017.

VEILLON, J.M. Architecture des espèces néo-calédoniennes du genre *Araucaria*. **Candollea**, v.35, n. 2, p.609-640, 1980.

WENDLING, I. Enxertia e florescimento precoce em *Araucaria angustifolia*. Embrapa Florestas, Colombo. Comunicado Técnico 272, 7 p. 2011.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new ex vitro method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, v. 39, n. 3, p.343-353, 23 out. 2010. DOI: 10.1007/s11056-009-9175-2.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. Vegetative rescue and cuttings propagation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, v.39, n.1, p.93-104, 2015. doi: 10.1590/0100-67622015000100009

WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; HOFFMANN, H.A.; BETTIO, G.; HANSEL, F.A. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, v.33, n.2, p.: 309-319, 2009.

WENDLING, I.; STUEPP, C.A.; ZANETTE, F. Produção de mudas de araucária por estaquia e miniestaquia. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017. cap. 3, p. 63-106.

WENDLING, I.; ZANETTE, F.; RICKLI-HORSTI, H.C.; CONSTANTINO, V.; Produção de mudas de araucária por enxertia. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017. cap. 4, p. 108-144.

ZANETTE, F.; DANNER, M.A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017. cap. 1, p. 15-39.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L.S.; BIASI, L.A.; Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through the four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.4, p.1364-1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York, North Carolina State University, 1984. 505 pp.

5 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BORBULHAS EM JARDIM CLONAL DE *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

RESUMO

Araucaria angustifolia é uma espécie considerada em extinção que tem sua supressão proibida por lei, o que causa o pouco interesse em novos plantios. Uma alternativa é direcionar o plantio visando a produção comercial de pinhões por meio de plantas enxertadas. No entanto, além da escassez de matrizes selecionadas ainda se esbarra nas limitações relativas a origem da brotação (tronco e galho). Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade e morfologia de brotações em matrizes enxertadas de *Araucaria angustifolia* mantidas em jardim clonal, após poda. O experimento foi instalado na Fazenda Experimental da UFPR em plantas de um jardim clonal com três anos. Foram avaliadas 12 plantas de cada matriz (Kaiová e Multiflora). Para a indução das brotações foi feito a poda a 10 cm acima da área enxertada em março de 2017. A partir do início das brotações as medições ocorreram a cada 30 dias, por um período de seis meses, onde foram avaliados: número, altura e diâmetro das brotações. No geral, foi constatado número expressivo de brotações por planta. A poda é uma alternativa para a produção de propágulos ortotrópicos de matrizes selecionadas. A intensidade das brotações, bem como seu crescimento em altura e diâmetro, evidencia alta capacidade de produção de propágulos em um jardim clonal. O efeito da dominância apical é pouco significativo em brotações originadas da poda de araucárias enxertadas até os 6 meses.

Palavra-chave: Pinheiro do Paraná; Propagação; Dominância apical; Propágulos;

POTENTIAL FOR PRODUCTION OF BUDS IN CLONAL FORESTRY OF *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is a species considered threatened with extinction, and has its suppression forbidden by law, which causes little interest in new plantations. An

alternative is to direct the planting for commercial production of pine nuts by grafted plants. However, in addition to the scarcity of selected matrices, there are still limitations regarding the origin of budding (trunk and branch). Thus, the objective of this work was to evaluate the amount and morphology of sprouts in grafted matrices of *Araucaria angustifolia* maintained in clonal forestry, after pruning. The experiment was conducted in the Experimental Farm of UFPR in plants of a three year old clonal forestry. Twelve plants of each matrix (Kaiová and Multiflora) were evaluated. For the induction of sprouts, pruning was done 10 cm above the grafted area in March 2017. From the beginning of the shooting, the measurements occurred every 30 days for a period of six months. The number, height and diameter of shoots were evaluated. In general, it was verified a significant number of shoots per plant. Pruning is an alternative for the production of orthotropic propagules of selected matrices. The intensity of the shoots, as well as their growth in height and diameter, evidences high capacity of propagules production in a clonal forestry. The effect of apical dominance is insignificant in sprouts originated from the pruning of araucarias grafted until the 6 months.

Key words: Pinheiro do Paraná; Propagation; Apical dominance; Propagules.

5.1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, popularmente conhecida por pinheiro do Paraná ou araucária, é uma espécie nativa do Brasil e dominante na Floresta Ombrófila Mista, ou Mata de Araucárias (MARAN et al., 2016; PELISSARI et al., 2016; GASPARIN et al., 2017; ZANETTE et al., 2017). É uma árvore que fornece madeira de elevada qualidade para serraria, produção de papel e suas sementes, conhecidas como pinhão, são utilizadas na alimentação humana e pela fauna silvestre (ELBL et al., 2014; ZANETTE et al., 2017).

A exploração desordenada e o desmatamento ocorrido com mais frequência na segunda metade do século passado, resultaram em uma drástica redução da Mata de Araucárias, o que levou a espécie *A. angustifolia* a ser considerada em extinção. Atualmente estima-se que restam aproximadamente 2% de sua área original (THOMAS, 2013; ZANETTE et al., 2017).

A. angustifolia pertence à família Araucariaceae e possui polo meristemático na axila de cada acícula, ou seja, células capazes de se diferenciarem quando livres da dominância apical (IRITANI et al., 1992; BURROWS, 2002; WENDLING et al., 2017b). O crescimento da gema apical inibe o desenvolvimento das gemas laterais (axilares), fenômeno fisiológico conhecido como dominância apical, o qual é regulado pela auxina que é um hormônio vegetal geralmente produzida no meristema apical de plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Segundo os autores, a poda em geral, resulta no desenvolvimento de uma ou mais brotações laterais que antes estavam inibidas pelo meristema apical.

Quanto à estrutura de copa, a *A. angustifolia* apresenta dimorfismo dos ramos (ortotrópicos e plagiotrópicos). Essa característica foi reportada já nos primeiros trabalhos sobre propagação vegetativa da espécie (GURGEL; GURGEL-FILHO, 1967; KAGEYAMA; FERREIRA, 1975), sendo apontada como um fator limitador. Trabalhos recentes (CONSTANTINO e ZANETTE, 2015; WENDLING; BRONDANI, 2015; WENDLING et al., 2017) confirmam as limitações devido ao plagiotropismo da espécie. No entanto, os autores alcançaram resultados positivos utilizando propágulos de origem ortotrópica, aqueles mais escassos na planta. A técnica de enxertia mais recomendada foi a borbúlia de placa.

Para contornar a escassez de material propagativo foram propostas diversas técnicas para a sua multiplicação, onde se destacaram a indução de brotações por meio da decepta na base da planta para a estaquia (WENDLING et al., 2017 a), apesar de legalmente proibida em araucárias nativas, e a poda do ápice para obtenção de brotações para enxertia (WENDLING et al., 2009), mais indicada devido resultar em brotações fisiologicamente mais maduras.

Outra técnica complementar, que também pode ser usada para multiplicação de material oriundo do resgate de matrizes selecionadas, é a enxertia temporária em ramos plagiotrópicos da araucária (CONSTANTINO e ZANETTE, 2015). De acordo com os autores, essa técnica é indicada quando não há porta-enxertos disponíveis para a enxertia definitiva. Deve ser aplicada preferencialmente nos ramos dos verticilos superiores, que normalmente são mais vigorosos. É importante que haja compatibilidade de diâmetro entre ramo e propágulo. É possível enxertar em todos os ramos do verticilo e em mais de um verticilo por planta. Geralmente a coleta dos propágulos ocorre entre 6 a 8 meses com brotações atingindo entre 15 a 20 cm. Considerando que cada brotação tem potencial para fornecer de 5 a 8

enxertos aos seis meses da enxertia, essa técnica apresenta vantagem em relação ao aproveitamento de área, quando comparada a outras técnicas de multiplicação de matrizes.

Embora as técnicas propostas contribuam para a multiplicação de genótipos selecionados, são laboriosas. A utilização de jardim clonal de araucária poderia ser uma alternativa para o fornecimento de borbulhas em larga escala.

A avaliação de jardim clonal em campo para produção de estacas já foi abordada por Wendling et al., (2016, 2017a), no entanto, não há detalhes em relação a produção de borbulhas. É preciso conhecer mais a respeito da instalação, manejo, capacidade de brotação das plantas e, principalmente, a influência da dominância apical sobre crescimento dos brotos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de brotações/borbulhas e a influência da dominância apical em um jardim clonal a campo, com matrizes selecionadas de araucária.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em um jardim clonal de araucária com aproximadamente três anos, localizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Paraná, no município de Pinhais/PR (25° 23' 26" S e 49° 07' 44"; altitude 996 m).

O jardim clonal foi montado a partir de plantas enxertadas. Os porta-enxertos foram produzidos a partir de sementes e tinham em média dois anos no momento da enxertia. Os propágulos foram obtidos de duas matrizes selecionadas para produção de pinhões, uma Multiflora, que também produz pinhões nas grimpas e a Kaiová, cujos pinhões geralmente são maiores do que aqueles encontrados no mercado. A técnica de enxertia empregada foi a borbulhia de placa, como recomendado por Wendling et al. (2017 b).

As plantas foram enviadas para o campo com aproximadamente 1,4 metro de altura e com brotações dos enxertos em torno de 15 cm.

A instalação do jardim clonal ocorreu em novembro de 2014. Iniciou com a abertura das covas com dimensões de 50x50x50 cm, alinhadas e com espaçamento de 2x2. Na terra retirada da cova foram misturados adubo e calcário e em seguida devolvida para cova, conforme Zanette (2014). O plantio só ocorreu

dois meses depois, momento em que foi realizado o coroamento ao redor das plantas. A área do jardim clonal foi roçada periodicamente, sempre que verificada a necessidade.

Foram selecionadas 24 plantas de duas matrizes (12 da Kaiová e 12 da Multiflora). Em março de 2017 foi realizada a poda destas plantas a 10 cm acima da área enxertada para a indução das brotações.

Ao iniciarem as brotações foram realizadas medições a cada 30 dias por um período de seis meses. Foram avaliados número, altura e diâmetro das brotações. O diâmetro só foi medido quando as brotações apresentavam altura maior que 10 cm. Foi calculado o incremento mensal das brotações por matriz.

Para verificar a intensidade da dominância apical foi utilizada a correlação entre a quantidade e altura média das brotações. Também foi feito a separação mensal por classe de alturas das brotações para verificar o efeito ao longo do tempo.

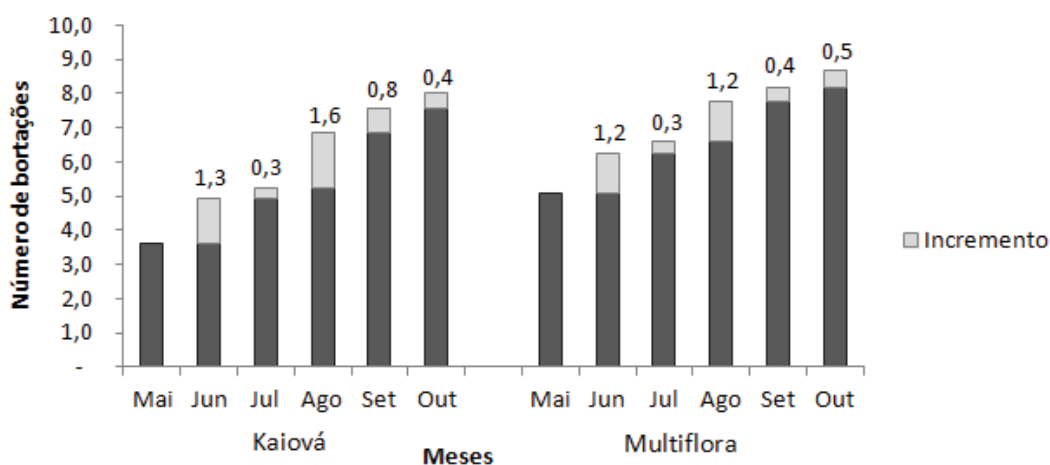
No final do experimento, após seis meses da poda, foi calculada a produção de borbulhas. Com base em trabalhos de enxertia da espécie, foi considerado que um segmento de 2 cm de propágulo tem potencial para se confeccionar três enxertos. Neste cálculo não foi descontada a região de inserção da ramificação, uma vez que não foram identificadas as brotações com ramificação.

Foram calculadas as estatísticas descritivas para os dados obtidos.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas brotações em todas as plantas já a partir do segundo mês da realização da poda (FIGURA 5.1).

A poda liberou a planta da dominância apical, resultando em brotações ao longo do caule. *A. angustifolia*. O crescimento da gema apical inibe o desenvolvimento das gemas laterais (axilares). Esse fenômeno fisiológico conhecido como dominância apical é regulado pela auxina, hormônio vegetal geralmente produzido no meristema apical das plantas. A remoção do ápice caulinar por meio da decapitação, em geral resulta no desenvolvimento de uma ou mais gemas/brotações laterais que estavam dominadas pelo meristema apical (TAIZ; ZEIGER, 2013).

FIGURA 5.1 – NÚMERO DE BROTAÇÕES POR PLANTA ENXERTADA DE *Araucaria angustifolia*.

No caso da *A. angustifolia* foi observada média de 3,6 e 5,1 brotações por planta para matriz Kaiová e Multiflora, respectivamente, aos dois meses após a remoção do ápice caulinar (FIGURA 5.1).

Com a liberação da planta do efeito da dominância apical houve estímulo contínuo para o desenvolvimento das gemas laterais, conforme demonstrado pelo incremento mensal (FIGURA 5.1), resultando grande variação na quantidade de brotações por matriz (TABELA 5.1).

TABELA 5.1 – ALTURA, DIÂMETRO E NÚMERO DE BROTAÇÕES DAS DUAS MATRIZES DE *Araucaria angustifolia* AOS 6 MESES.

VARIÁVEIS	KAIOVÁ				MULTIFLORA			
	Máx	Méd	Mín	E.P	Máx	Méd	Mín	E.P
Número de Brotações por planta	13,0	8,0	4,0	0,8	16,0	8,7	2,0	0,9
Altura da Brotação do enxerto (cm)	84,0	14,8	0,5	2,2	73,0	23,1	0,5	2,0
Diâmetro da Brotação (mm)	28,9	19,9	11,0	0,9	25,0	16,5	10,1	0,4

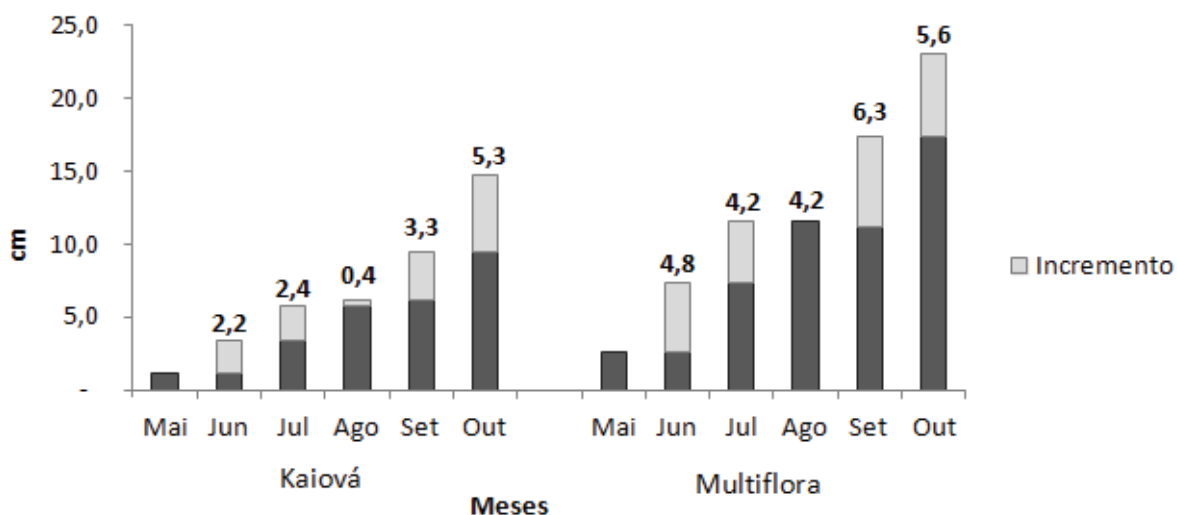
Máx= máximo; Med= médio; Mín= mínimo; E.P= erro padrão

As plantas da matriz multiflora apresentaram número de brotações superior em relação a Kaiová, com médias 8,7 e 8 por planta, totalizando no final de seis meses 104 e 96 brotações, respectivamente.

Na matriz Kaiová foi possível observar de 4 a 13 brotações por planta. A altura destas brotações variou entre 0,5 e 84,0 cm. Já nas plantas da matriz Multiflora foi observada de 2 a 16 brotações por planta e altura variando entre 0,5 e

73,0 cm (TABELA 5.1). Apesar da variação, na FIGURA 5.3 é possível observar um incremento contínuo, mesmo durante a estação fria.

FIGURA 5.3 – ALTURA MENSAL MÉDIA DAS BROTAÇÕES DUAS VARIEDADES DE *Araucaria angustifolia*

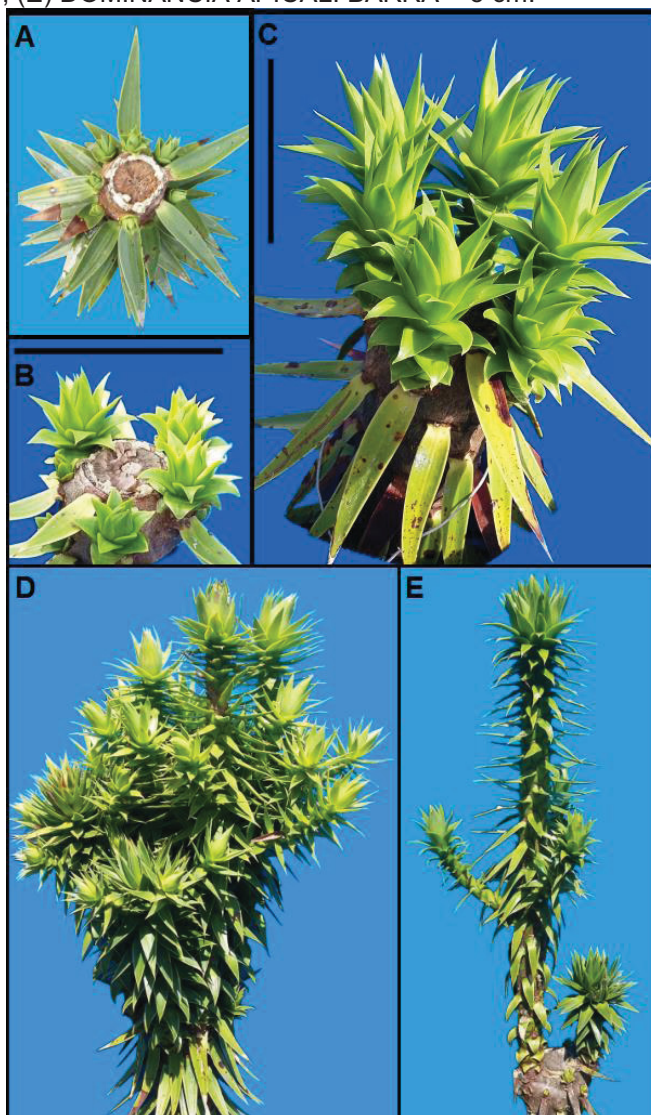


Os resultados coincidem com as observações realizadas por Solórzano-Filho (2001), que constatou um crescimento ininterrupto e simultâneo, durante todo o ano em *A. angustifolia*. Porém, a taxa de crescimento vegetativo foi reduzida na estação fria.

Independente da matriz, todas as brotações tiveram morfologia de tronco (FIGURA 5.2).

Em Araucariáceas os dois únicos meristemas normalmente capazes de produzir brotações com crescimento ortotrópico estão presentes na gema terminal e nas gemas dormentes ou polos meristemáticos distribuídos ao longo do tronco principal (NIKLES, 1964). Portanto, somente propágulos destas origens são indicados para propagação vegetativa da araucária (WENDLING et al., 2017), o que reflete na escassez de brotações com aptidão para enxertia ou estaquia, limitando o uso intensivo destas técnicas e condicionando a aplicação para produção de mudas da espécie (CONSTANTINO e ZANETTE, 2015). Isto torna os resultados obtidos neste trabalho particularmente interessantes, pois além da quantidade de brotações, todas apresentaram morfologia de tronco, contornando a dificuldade de obtenção deste tipo de propágulo.

FIGURA 5.2- INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM PLANTAS ENXERTADAS DE *A. angustifolia*: (A) BROTAÇÕES AÓS 2 MÊSES; (B) AOS 3 MESES; (C) AOS 4 MESES; (D) AOS 6 MESES; (E) DOMINÂNCIA APICAL. BARRA = 5 cm.



Conforme TABELA 5.2, com avaliações no outono e inverno, período em que a araucária tem crescimento mais lento, não foi possível identificar efeito expressivo da dominância apical até os seis meses de acompanhamento do experimento.

Da mesma forma que a quantidade e altura das brotações, o diâmetro também apresentou uma expressiva variação ficando entre 11 e 28,9 mm para matriz Kaiová e entre 10,1 e 25,0 mm para variedade Multiflora (TABELA 5.1), com médias de 19,9 e 16,5 mm, respectivamente, na última avaliação aos seis meses.

TABELA 5.2 – NÚMERO DE BROTAÇÕES EM PLANTAS ENXERTADAS NAS DIFERENTES CLASSES.

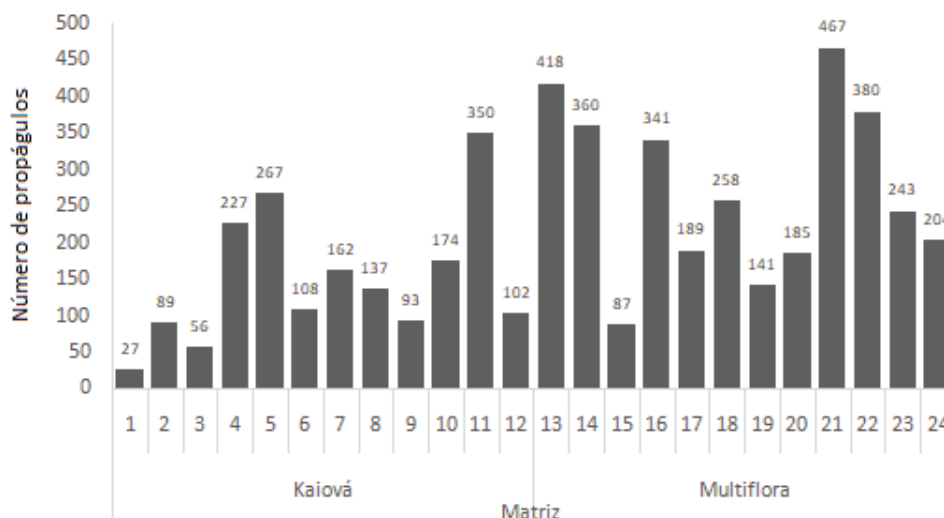
CLASSE	NÚMERO DE BROTAÇÕES						Total Geral
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	
0 - 10	91	110	79	102	99	107	588
10 - 20	3	11	44	44	14	11	127
20 - 30		2	9	16	34	12	73
30 - 40		1	2	4	17	11	35
40 - 50					8	17	25
50 - 60					2	17	19
60 - 70						9	9
70 - 80						3	3

Nas condições deste experimento, com a poda realizada no início de março e avaliação no decorrer do outono e inverno, para região de Curitiba, foram encontradas brotações ortotrópicas de até 84 cm de comprimento e 28,9 mm de diâmetro, aos seis meses após a poda. Brotações com estas características estão aptas para fornecimento de borbulhas viáveis para enxertia da araucária.

Tendo em vista o vigor, as dimensões e também a presença de ramificação em grande parte das brotações aos seis meses, seria possível reduzir o prazo da colheita dos propágulos, sem que ocorresse prejuízo no processo de enxertia. Na verdade é preferível que a colheita dos brotos aconteça antes que inicie a ramificação, pois assim, além de ganhar tempo, evita-se ter que eliminar a região de inserção dos ramos, que não é usada na enxertia. Embora as brotações ainda apresentem espessura avantajada, também podem ser aproveitadas para confecção de estacas.

Com a quantidade total de brotações e o comprimento de cada uma, foi possível criar um cenário sobre o potencial de produção de propágulos. Com as brotações da matriz Kaiová seria possível obter aproximadamente 1792 propágulos. Cabe ressaltar que não foram descontadas a região de inserção dos ramos. No entanto, nas brotações com ramificação é recomendado fazer o corte a pelo menos 2 cm abaixo e acima do verticilo, descartando-o, pois material obtido desta região pode originar brotações com características de ramos. Com as brotações da matriz Multiflora seria possível obter mais 3271 propágulos, totalizando 5063 ou média de 211 propágulos por planta (FIGURA 5.4).

FIGURA 5.4 - POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BORBULHAS POR PLANTA.



A correlação ($r = -0,47$) entre a quantidade e altura das brotações, indica competição moderada entre brotações, refletindo no crescimento em altura. De um modo geral, nas plantas com brotação intensa não foi verificado efeito expressivo da dominância apical até os seis meses (FIGURA 5.2 D). Estas brotações geralmente iniciaram na mesma altura na região de corte, portanto tiveram a mesma oportunidade de crescimento (FIGURA 5.2 A e C). Sempre que as brotações iniciaram mais distantes da região de corte, elas sofreram algum impedimento de crescimento por parte das brotações superiores. Na FIGURA 5.2-E é possível verificar um acentuado efeito da dominância apical. De acordo com Taiz e Zeiger (2013), a dominância apical refere-se ao controle que a gema terminal exerce sobre a brotação de gemas laterais presentes no caule e o seu crescimento. Nesse sentido, pode-se concluir que a brotação mais alta é a responsável pela formação da nova copa, seu meristema apical é o principal sintetizador de auxina, resultando na dominância da brotação menor.

Os resultados obtidos mostram viabilidade da indução de brotações em plantas enxertadas de araucária em jardim clonal a campo.

5.4 CONCLUSÃO

- A poda é uma alternativa para a produção de propágulos ortotrópicos em jardim clonal.

- A quantidade de brotações, bem como o crescimento em altura e diâmetro, evidencia alta capacidade de produção de propágulos em um jardim clonal a campo.
- Até os seis meses o efeito da dominância apical é pouco significativo em brotações originadas da poda de araucárias enxertadas.

REFERÊNCIAS

BURROWS, G. E. Axillary meristems and the development of epicormic buds in wollemi pine (*Wollemia nobilis*). **Annals Of Botany**, v. 92, n. 6, p.835-844, 8 out. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg207>.

CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F. Produção de borbulhas ortotrópicas para enxertia de *Araucaria angustifolia*. **Acta Biológica Paranaense**, v. 44, n. 3-4, p. 49-55, 2015.

ELBL, P.; LIRA, B.S.; ANDRADE, S.C.S.; JO, L.; DOS SANTOS, A.L.W.; COUTINHO, L.L.; FLOH, E.I.S.; ROSSI, M. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, v. 120, n. 3, p.903-915, 11 jun. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0523-3>.

GASPARIN, E.; FARIA, J.M.R.; JOSÉ, A.C.; HILHORST, H.W.M. Physiological and ultrastructural responses during drying of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia*. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 112-129, 2017. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2017.45.1.01>.

GURGEL, J. T. A; GURGEL-FILHO, C. A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze, visando à formação de pomares de sementes. **Sivilcultura em São Paulo**, v. 6, p. 153-155, 1967.

IRITANI, C.; ZANETTE F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biológica Paranaense**, v. 21, n. 1, 2, 3, 4, p. 57-76, 1992.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia em *Araucaria angustifolia*. **IPEF**, n. 11, p. 95-102, 1975.

MARAN, J.C.; ROSOT, M.A.D.; RADOMSKI, M.I.; KELLERMANN, B. Análise de sobrevivência e germinação em plantios de *Araucaria angustifolia* derivado de mudas e sementes. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p.1349-1360, 28 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509825154>.

NIKLES D.G. A. *cunninghamii* “bark-patch” grafting in the field. **Australian Forest Research**, v.1, n.1, p.45-47, 1964.

OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. P.; SOUZA, G. K.; NICOLETTI, M. F.; LIZ, T. O.; PIKART, T. G. Metodologia alternativa para o Teste de Tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p.468-474, dez. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.064413>.

PELISSARI, A.L.; FIGUEIREDO FILHO, A.; SANQUETTA, C.R.; EBLING, A.A.; ROVEDA, M.; CYSNEIROS, V.C. Estrutura espacial arbórea de um remanescente natural de floresta ombrófila mista. **Biofix Scientific Journal**, v. 1, n. 1, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T32975A2829141. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T32975A2829141.en>. Downloaded on 20 December 2017.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; HOFFMANN, H. A.; BETTIO, G.; HANSEL, F.A. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, v. 33, n.2, p 309-319, 2009.

WENDLING, I. Enxertia e florescimento precoce em *Araucaria angustifolia*. **Comunicado Técnico 272**, Embrapa Florestas, Colombo, Junho, 2011.

WENDLING, I. Tecnologia de enxertia de *Araucaria angustifolia* para produção precoce de pinhões, com plantas de porte reduzido. **Comunicado Técnico 351**, Colombo, Embrapa Florestas, Maio, 2015.

WENDLING, I.; STUEPP, C. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Rooting of *Araucaria angustifolia*: types of cuttings and stock plants sex. **Revista Árvore**, v. 40, n. 6, p. 1013-1021, dez. 2016. DOI: 10.1590/0100-67622016000600006.

WENDLING, I.; STUEPP, C.A.; ZANETTE, F. Produção de mudas de araucária por estaquia e miniestaquia. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017a. cap. 3, p. 63-106.

WENDLING, I.; ZANETTE, F.; RICKLI-HORSTI, H.C.; CONSTANTINO, V. Produção de mudas de araucária por enxertia. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017b. cap. 4, p. 107-144.

WILSON, B. F. Apical control of branch growth and angle in woody plants. **American Journal of Botany**, v.87, n.5, p. 601-607, 2000.

ZANETTE, F. **A araucária como fruteira para a produção de pinhões**. Jaboticabal: Funep, 2010. 25 p. (Série frutas nativas).

ZANETTE, F.; DANNER, M.A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017. cap. 1, p. 15-30.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L. S.; BIASI, L. A. Grafting of *Araucaria angustifolia* through the four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1364-1370, dez. 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011000400040

ZANETTE, F, Manual de enxertia de araucária para produção de pinhões Disponível em:

<www.sistemafaep.org.br/wp-content/uploads/2014/.../FolderEnxertinhaAraucaria.pdf>. Acesso em: 06 março 2018.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York, North Carolina State University, 1984, 505 pp.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T.D.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; TELES, C.H.A.; MARTINS, G.R.; BEZERRA, R.Q.J.; COSTA, E.C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p. 80-93, 2012.

ALVARENGA, L.R.; CARVALHO, V.D. de. Uso de substancias promotoras de enraizamento de estacas de frutíferas. **Informativo Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

ANSELMINI, J. I.; Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Ktze, na região de Curitiba – PR. Curitiba, 62 F. Dissertação (Mestrado em Agronomia Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná. 2005.

ANSELMINI, J.I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.967-973, 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000400010

BÁRBARA, E.P.S.; SILVA, A.A.; SOUZA, M.M.O.R.; GURGEL, Z.E.R.; MARCHI, M.N.G.; BELLINTANI, M.C. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia**, v.9, n.2, p. 91-96. 2015;

BARISON, A.; SILVA, C.W.P.; CAMPOS, F.R.; SIMONELLI, F.; LENZ, C.A.; FERREIRA, A.G. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance In Chemistry**, p.1-9, 29 jun. 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.2629>.

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: A practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 15-32.

BERJAK, P; PAMMENTER, N.W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: approaches and problems. **International Journal of Plant Science**, v.175, n. 1, p.29–39, 2014;

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1986. 445 p.

BOTIN, A.A.; CARVALHO, A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista De Ciências Agroambientais**, v. 13, n. 1, p. 83-96, 2015.

BRAGA, M.F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUSA, A.A.T.C.; FALEIRO, F.G.; REZENDE, L.N.; JUNQUEIRA, K.P. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de passiflora. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 284-288, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009; 399p.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M. A.; PIRES, P. P. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 153-158, 2008.

BURROWS, G. E. Axillary Meristems and the Development of Epicormic Buds in Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*). **Annals Of Botany**, v. 92, n. 6, p.835-844, 8 out. 2003. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg207>.

BURROWS, G. E.; MEAGHER, P. F.; HEADY, R. D. An Anatomical Assessment of Branch Abscission and Branch-base Hydraulic Architecture in the Endangered *Wollemia nobilis*. **Annals Of Botany**, v. 99, n. 4, p.609-623, 30 nov. 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm003>.

CARVALHO, A.; KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.. O dimorfismo dos ramos em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 10, n. 6, p.151-159, jun. 1950. <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87051950000600001>.

CARVALHO, P.E.R. Pinheiro bravo (*Podocarpus lambertii*). Circular técnica - 95 Embrapa Florestas, 2004.

CARVALHO, P.E.R. Pinheiro-do-Paraná. Circular técnica - 60 EMBRAPA Florestas. Colombo PR p.17. 2002.

CHMIELARZ, P. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.). **Annals of Forest Science**, v.66, n.4, p.405–405, 2009.

CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F. Produção de borbulhas ortotrópicas para enxertia de *Araucaria angustifolia*. **Acta Biologica Paranaense**, Curitiba, v.44, n.4-5, p.49-55, 2015.

COSTA, E.C.; BOSCARDIN, J. Ocorrência de Lagartas Desaciculadoras em *Podocarpus lambertii* Klotzsh ex Eichler no Sul do Brasil. **Entomobrasilis**, v. 7, n. 3, p.238-240, 2014. <http://dx.doi.org/10.12741/ebrazilis.v7i3.438>.

CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**, v.2, p.73-95, 2013.

CUEVAS-PÉREZ, F. E.; GUIMARÃES, E. P.; BERRÍO, L. E.; GONZÁLEZ, D. I. Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean, 1971 to 1989. **Crop Science**, v.32, p.1054-1059, 1992.

CURTO, R.D.A.; DE MATTOS, P.P.; BRAZ, E.M., NETTO, S.P.; ZACHOW, R. Massa específica básica da madeira de *Araucaria angustifolia* em povoamento superestocado. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 85, p.51-59, 31 mar. 2016. [Http://dx.doi.org/10.4336/2016.pfb.36.85.963](http://dx.doi.org/10.4336/2016.pfb.36.85.963).

DANNER, M.A.; ZANETTE, F.; RIBEIRO, J.F. O cultivo da araucária para produção de pinhões como ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.32, n.72, p.441-451, 28 dez. 2012. Embrapa Florestas. <http://dx.doi.org/10.4336/2012.pfb.32.72.441>.

DIAS, P.C.; ATAÍDE, G.M.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; PAIVA, H.N. Propagação vegetativa de *Schizolobium amazonicum* por estaquia. **Cerne**, v.21, n.3, p.379-386, set. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/01047760201521031467>.

DIAS, P.C.; DE OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p.453-462, 28 dez. 2012. <http://dx.doi.org/10.4336/2012.pfb.32.72.453>.

DIAS, R.M.S.L.; FRANCO, E.T.H.; DIAS, C.A. Enraizamento de estacas de diferentes diâmetros em *Platanus acerifolia* (Aiton) Willdenow. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.2, p.127-136, 1999.

DINIZ, P.S.C.; MATA, M.E.R.M.C.; BRAGA, M.E.D. Influência das técnicas de descongelamento na qualidade fisiológica nas sementes de milho crioconservadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.1, n.1, p.1-12, 1999.

DUTRA, L.F.; KERSTEN, E. Efeito do substrato e da época de coletas de ramos no enraizamento de estacas de ameixeira (*Prunus salicina* L.). **Ciência Rural**, v.26, n. 3, p. 361-366, 1996.

ELBL, P.; LIRA, B.S.; ANDRADE, S.C.S.; JO, L.; DOS SANTOS, A.L.W.; COUTINHO, L.L.; FLOH, E.I.S.; ROSSI, M. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, v. 120, n. 3, p.903-915, 11 jun. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0523-3>.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, In: ENGELMANN, F. AND TAKAGI, X. editors. **Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application**. Japan International. Center for Agricultural Sciences, Japan and International Plant Genetic Resources Institute. Roma, Italy, 2000.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.47, n.1, p.5-16, 2011.

ENGELMANN, F.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T. Introduccion a La conservacion *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. In: ENGELMANN, F.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T. editors. **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; 2013.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.;

NACHTIGAL, J.C. (Ed.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.69-109.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: Universitária, 1995. 178p.

FARIA, C.V.N.R.P.; FREITAS, R.T.; FIGUEIREDO, J.R.M.; SILVA, D.P.C.; REIS, M.V. Criopreservação de sementes de *Physalis angulata* L. por meio da desidratação em sílica gel. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.12, n.2, p.27-33, 2016.

FERRARI, E. A. P. et al. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n.1, p.172-177, 2016.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 22 p.

FERRIANI, A.P.; MAYER, J.L.S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; BONA, C.; KOEHLER, H.S.; DESCHAMPS, C.; CARPANEZZI, A.A.; OLIVEIRA, M.C. Estaquia e anatomia de Vassourão-branco. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.2, p.159- 166, 2008.

FONSECA, A.G.; MATUDA, J.J.M.; ALMEIDA, J.O.; NUNES, U.R.; MACHADO, E.L.M. Qualidade fisiológica de sementes de *Pinus elliotti* Engelm submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **Cerne**, v.18, n.3, 2012.

GARCIA, L.C.; NOGUEIRA, A.C. Resposta de sementes de *Podocarpus lambertii* e *Podocarpus sellowii* – (Podocarpaceae) à dessecação. **Ciência Florestal**, vol. 18, n. 3, pp. 347-352, 2008.

GARCIA, L.C.; NOGUEIRA, A.C.; ALQUINI, Y. Aspectos morfoanatômicos de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz. e *Podocarpus sellowii* Klotz. – Podocarpaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.3, p.129-134, 2006.

GASPARIN, E.; FARIA, J.M.R.; JOSÉ, A.C.; HILHORST, H.W.M. Physiological and ultrastructural responses during drying of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia*. **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 112-129, 2017. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2017.45.1.01>.

GERDING, V.; HERMOSILLA, M.E.; GREZ, R. Sustratos de corteza compostada para la propagación vegetativa de estacas de tallo de *Podocarpus nubigena* Lindl, y *Eucryphia cordifolia* Cav. **Bosque**, n. 17, v.2, p. 57-64, 1996.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v.23, n.1, p. 27-33, 2010.

GOLDFARB, M.; MARTINS, M.E.D.; MATA, M.E.R.M.; PIMENTEL, L.W.; SEVERINO, L.S.S. Teor de água limite para crioconservação das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.10, n.2, p. 121-129, 2008.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; MARTINEZ-MONTERO, M.E.; CRUZ-CRUZ, C.A.; ENGELMANN, F. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity. In: AHUJA, M.R. e RAMAWAT, K.G. editors. **Biotechnology and Biodiversity**, Development and Biodiversity; 2014.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.S.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. Exploracao, manejo e conservacao da Araucaria (*Araucaria angustifolia*). In: SIMOES, L. L.; LINO, C. F. (Eds.) **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. Sao Paulo: SENAC Sao Paulo, 2002. p. 85–101.

GURGEL, J. T. A; GURGEL-FILHO, C. A. Métodos de enxertia para o pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze, visando à formação de pomares de sementes. **Silvicultura em São Paulo**, v. 6, p. 153-155, 1967.

HACKBARTH, C.; SOFFIATTI, P.; ZANETTE, F.; FLOH, E.I.S.; MACEDO, A.F.; LAUREANO, H.A. Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Journal Of Forestry Research**, p.1-8, 28 dez. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-017-0581-6>.

HARTMANN, H. T. **Plant propagation**: Principles and practices. 8 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation**: principles and practices. 8th ed. Boston: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HUSEN, A.; PAL, M. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **New Forest**, v.31, p. 57-73, 2006.

INOUE, M.T.; RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S.; **Projeto madeira do Paraná**. Fundação de pesquisas florestais do Paraná. Curitiba; 1984.

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. **Silvicultura**, v. 8, n. 28, p. 313-317, 1983.

IRITANI, C.; ZANETTE, F.; CISLINSKI, J. Aspectos anatômicos da cultura *in vitro* da *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axiliares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biologica Paranaense**, v. 21, n. 1- 4, p. 57-76, 1992.

IUCN Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T34086A2844519.en> . Dados de 05 de dezembro de 2016.

JANNAT, M.; HOSSAIN, M.K.; ALAM, M. S.; HOSSAIN, M. A.; KAMRUZZAMAN, M. Vegetative propagation of Tali (*Palaquium polyanthum* Engl.) for commercial harvest and landscape conservation. **Rhizosphere**, v.3, p. 9-12, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.11.003>.

JANNAT, M.; HOSSAIN, M.K.; KAMRUZZAMAN, M. Vegetative propagation potential of Kusum (*Schleichera oleosa* Lour) by stem cutting from young stock plants. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, v.2, n.10, p. 106-110, 2016.

JANNAT, M.; HOSSAIN, M.K. Vegetative Propagation potential of Moss (*Brownlowia elata* Roxb) by Stem Cuttings from Young Stock Plants. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.7, n.8, p.1342-1348, 2016.

JARDIM BOTANICO DO RIO DE JANEIRO. **Gimnospermas in Flora do Brasil 2020 em construção.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB128477>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; PHANG, P.Y.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; MANCERA, R.L. **Current Issues in Plant Cryopreservation.** In: Katkov, I. editor. InTech; 2012.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **IPEF**, Piracicaba, v. 12, p. 95-102, 1975.

KALAISELVI, R.; RAJASEKAR, M.; GOMATHI, S. Cryopreservation of plant materials- A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 5, p. 560-564, 2017.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n.6, p.778- 800, 2011.

KHAN, A. G. Effects of Temperature Gibberellic Acid and Indolylacetic Acid on Root and Shoot Growth of Cutting From *Podocarpus Lawrencei* Hook F. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.21, n.3, p. 573-578, 1968.

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, A.E.; BENELLI, C. Cryopreservation of Embryogenic Cultures. In: Reed, BM editor. **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide.** New York, USA: Spinge; 2008.

LI, D.Z.; PRITCHARD, H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v.14, n.11, p.614-621, 2009.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.1, p. 176-177, 1962.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J.P. **Fichas de características das madeiras brasileiras.** São Paulo:IPT, 1989. 418 p

MARAN, J.C.; ROSOT, M.A.D.; RADOMSKI, M.I.; KELLERMANN, B. Análise de sobrevivência e germinação em plantios de *Araucaria angustifolia* derivado de mudas e sementes. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p.1349-1360, 28 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509825154>.

MARAN, J.C.; ROSOT, M.A.D.; RADOMSKI, M.I.; KELLERMANN, B. Análise de sobrevivência e germinação em plantios de *Araucaria angustifolia* derivado de mudas e sementes. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p.1349-1360, 28 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509825154>.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARINHO, L.C.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; AMORIM, A .M.; OLIVEIRA, R.P.; GIULIETT, A.M. Flora da Bahia: Podocarpaceae. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, vol. 16, 2016. <http://dx.doi.org/10.13102/scb1089>.

MARTINS, W. A.; MANTELLI, M.; SANTOS, S. C.; NETTO, A.P.C.; PINTO, F. Estaquia e concentração de reguladores vegetais no enraizamento de *Campomanesia adamantium*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n.1, p.58-64, 2015.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology-Cell Physiology**, v.247, p.125–142, 1984.

MEDEIROS, A.C.S.; ZANON, A. Conservação de sementes de Branquilha (*Sebastiania commersoniana* (Baillon) LB Smith & RJ Down.) e de pinheiro-bravo (*Podocarpus lambertii* Klotzch ex e NDL.) armazenadas em diferentes ambientes. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.36, p.57-69, 1998.

MICHALAK, M.; PLITTA, B.P.; TYLKOWSKI, T.; CHMIELARZ, P.; SUSZKA, J. Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe. **European Journal of Forest Research**, v.134, p.53–60, 2015.

MOLINA, T.F.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p. 72-81, 2006.

NASCIMENTO, J.P.B.; VIEIRA, D.C.M.; MEIADO, M.V. *Ex situ* seed conservation of brazilian cacti. **Gaia scientia**, v.9, n.2, p.111-116, 2015.

NASCIMENTO, W. M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. 432 p.

NAVROSKI, M.C.; PEREIRA, M.O.; HESS, A.F.; SILVESTRE, R.; ÂNGELO, A.C.; FAZZINI, A.J.; ALVARENGA, A.A.; Resgate e propagação vegetativa de *Sequoia sempervirens*. **Floresta**, v.45, n.2, p.383-392, 2015. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v45i2.35407>.

NEMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. I. Trees. Springer, Berlin, p 49–64, 1986.

NIENOW, A.A.; CHURA, G.; PETRY, C.; COSTA, C. Enraizamento de estacas de Quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Current Agricultural Science and Technology**, v.16, n.1-4, 2010.

NIKLES D.G. A. *cunninghamii* “bark-patch” grafting in the field. **Australian Forest Research**, v.1, n.1, p.45-47, 1964.

O'BRIEN, TP; FEDER, N; MCCULLY, ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. P.; SOUZA, G. K.; NICOLETTI, M. F.; LIZ, T. O.; PIKART, T. G. Metodologia alternativa para o Teste de Tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p.468-474, dez. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.064413>.

OSPINA, J.A.; GUEVARA, C.L.; CAICEDO, L.E.; BARNEY, V. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F. and TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm – Posters**. Japan International Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 384-388, 2000.

PAN, T.; LIN, L.; WANG, J.; LIU, Q.; WEI, C.; Long branch-chains of amylopectin with B-type crystallinity in rice seed with inhibition of starch branching enzyme I and IIb resist in situ degradation and inhibit plant growth during seedling development. **Bmc Plant Biology**, v.18, n.1, p.1-11, 8 jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-017-1219-8>

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The Role of Biotechnology**, v.5, n.7, p.43-54, 2006.

PELISSARI, A. L.; FIGUEIREDO FILHO, A.; SANQUETTA, C.R.; EBLING, A.A.; ROVEDA, M.; CYSNEIRO, V.C. Estrutura espacial arbórea de um remanescente natural de floresta ombrófila mista. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 1, n. 1, p.27-32, 2016.

PELISSARI, A.L.; FIGUEIREDO FILHO, A.; SANQUETTA, C.R.; EBLING, A.A.; ROVEDA, M.; CYSNEIROS, V.C. Estrutura espacial arbórea de um remanescente natural de floresta ombrófila mista. **Biofix Scientific Journal**, v. 1, n. 1, 2016.

PIJUT, P.M.; WOESTE, K.E.; MICHLER, C.H. Promotion of Adventitious Root Formation of Difficult-to-Root Hardwood Tree Species. **Horticultural Reviews**, p.213-251, 28 fev. 2011.

PONTES FILHO, F.S.T.; ALMEIDA, E.I.B.; BARROSO, M.M.A.; CAJAZEIRA, J.P.; CORREA, C.M. Comprimento de estacas e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) na propagação vegetativa de pitaia. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n. 4, p. 788-793, out-dez, 2014.

PRITCHARD, HW; NADARAJAN, J. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. In: Reed, BM editor. **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide**. New York, USA: Springer; 2008.

PUKACKI, P.M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two Acer species. **Trees**, v.29, p.385–396, 2015.

RAGAGNIN, L.I.M.; COSTA, E.C.; HOPPE, J.M. Maturidade fisiológica de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotzsch. **Ciência Florestal**, v.4, n.1, p. 23-41, 1999.

RAGONEZI, C.; KLIMASZEWSKA, K.; CASTRO, M. R.; LIMA, M.; OLIVEIRA P.; ZAVATTIERI, M. A. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. **Trees**, v. 24, p. 975-992, 2010. DOI: 10.1007/s00468-010-0488-8.

REED, M; UCHENDU, E. Controlled Rate Cooling. In: Reed, BM editor. **Plant Cryopreservation- A Pratical Guide**. New York, USA: Springer; 2008.

REITZ, P.R.; KLEIN, R.M.; **Araucariáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí Santa Catarina Brasil. 62 p. 1966.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499- 514, 1973.

ROCHA, S.C.; QUEIROZ, J.A.L.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Propagação vegetativa de espiroleira pela técnica da estaca. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.5, n.1-2, p.73-77, 2004.

ROLLI, E.; INCERTI, M.; BRUNONI, F.; VICINI, P.; RICCI, A. Structure activity relationships of N-phenyl-N'-benzothiazol-6-ylurea synthetic derivates: Cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement. **Phytochemistry**, v.74, p.159-165, 2012.

ROSA, G. G.; ZANANDREA, I. MAYER, N.A. BIANCHI, V.J. Propagação de porta-enxerto de *Prunus* spp. por estaca: efeito do genótipo, do estágio de desenvolvimento do ramo e tipo de estaca. **Revista Ceres**, v.64, n.1, p.90-97, fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764010013>.

SANTOS, I. R. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo.. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p.60-65, mai/jun 2001.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1999.

SILVA, F.A.Z.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2009.

SILVA, F.A.Z.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World congress on computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2009.

SIMÃO, E.; NAKAMURA, A. T.; TAKAKI, M. Época de colheita e capacidade germinativa de sementes de *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, São Paulo, v.7, n.1, p. 67-73, 2007.

SINGH, N. Principles and procedures for long-term conservation of orthodox seeds. In: Jacob S.R, Singh, N.; Srinivasan, K.; Gupta, V.; Radhamani, J.; Kak, A.; Pandey, C.; Pandey, S.; Aravind, J.; Bisht, I.S.; Tyagi, RK. (eds). **Management of Plant Genetic Resources**, 2015, cap. 19, p. 159-162.

SIQUEIRA, V.L.; FERREIRA, A.G. Germinação de sementes de *Podocarpus lambertii* Kl.: Características qualitativas e quantitativas. **Iheringia**, Porto Alegre, n.36, p.57-63, 1987.

STANWOOD, PC. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Kartha KK editor. **Cryopreservation of plant cells and organs**. CRC, Boca Raton, Florida; 1985, p.199-226.

STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHIMPER, A.F.W. Tratado de Botânica, 6ªed, Barcelona: Marin, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T32975A2829141. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T32975A2829141.en>. Downloaded on 20 December 2017.

TILLMAN-SUTELA, E.; KAUPPI, A. The morphological background to imbibition in seeds of *Pinus sylvestris* L. of different provenances. **Trees**, vol. 9, n.3, p.123–133, fev. 1995.

TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. In: Towill, LE, Bajaj, YPS editors. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 50. Berlin, 2002;

VALMORBIDA, J.; BOARO, C. S. F.; LESSA, A. O.; SALERNO, A. R. Enraizamento de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss (catigua) em diferentes estações do ano. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 435-442, 2008.

VEILLON, J.M. Architecture des espèces néo-calédoniennes du genre *Araucaria*. **Candollea**, v.35, n. 2, p.609-640, 1980.

VERNIER, R.M.; CARDOSO, S.B. Influência do ácido indol-butírico no enraizamento de estacas em espécies frutíferas e ornamentais. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v.3, n. 2, p. 11-16, 2013.

WAJS-BONIKOWSKA, A.; SMEDS, A.; WILLFÖR, S. Chemical composition and content of lipophilic seed extractives of some *Abies* and *Picea* species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 9, p.1194-1201, set. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600014>.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v.242, n.2, p.397–406, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; HOFFMANN, H. A.; BETTIO, G.; HANSEL, F.A. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, v. 33, n.2, p 309-319, 2009.

WENDLING, I. Enxertia e florescimento precoce em *Araucaria angustifolia*. **Comunicado Técnico 272**, Embrapa Florestas, Colombo, Junho, 2011.

WENDLING, I. Tecnologia de enxertia de *Araucaria angustifolia* para produção precoce de pinhões, com plantas de porte reduzido. **Comunicado Técnico 351**, Colombo, Embrapa Florestas, Maio, 2015.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new ex vitro method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, v. 39, n. 3, p.343-353, 23 out. 2010. DOI: 10.1007/s11056-009-9175-2.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. Vegetative rescue and cuttings propagation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, v.39, n.1, p.93-104, 2015. doi: 10.1590/0100-67622015000100009

WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; HOFFMANN, H.A.; BETTIO, G.; HANSEL, F.A. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, v.33, n.2, p.: 309-319, 2009.

WENDLING, I.; FERRARI, M.P.; DUTRA, L.F. Produção de mudas de corticeira-do-banhado por miniestaquia a partir de propágulos juvenis. Comunicado técnico, Colombo, n.130, p. 1-5, out. 2005.

WENDLING, I.; STUEPP, C. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Rooting of *Araucaria angustifolia*: types of cuttings and stock plants sex. **Revista Árvore**, v. 40, n. 6, p. 1013-1021, dez. 2016. DOI: 10.1590/0100-67622016000600006.

WENDLING, I.; STUEPP, C.A.; ZANETTE, F. Produção de mudas de araucária por estaquia e miniestaquia. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017. cap. 3, p. 63-106.

WENDLING, I.; ZANETTE, F.; RICKLI-HORSTI, H.C.; CONSTANTINO, V. Produção de mudas de araucária por enxertia. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017b. cap. 4, p. 107-144.

WILSON, B. F. Apical control of branch growth and angle in woody plants. **American Journal of Botany**, v.87, n.5, p. 601-607, 2000.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed., Viçosa/MG: Editora UFV, 2013. 279 p.

ZANETTE, F, Manual de enxertia de araucária para produção de pinhões Disponível em: <www.sistemaafaep.org.br/wp-content/uploads/2014/.../FolderEnxertinhaAraucaria.pdf>. Acesso em: 06 março 2018.

ZANETTE, F. **A araucária como fruteira para a produção de pinhões**. Jaboticabal: Funep, 2010. 25 p. (Série frutas nativas).

ZANETTE, F.; DANNER, M.A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: ZANETTE, F.; WENDLING, I. (Ed.). **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. 2017. cap. 1, p. 15-39.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L.S.; BIASI, L.A.; Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through the four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.4, p.1364-1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York, North Carolina State University, 1984. 505 pp.

ZUFFELLATO-RIBAS; C.K.; RODRIGUES, D. J. **Estaquia: Uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos**. Curitiba, EUFPR, 2001.